

# **Einfluss einer Hepatitis C-Virus-Infektion auf die Interaktion von natürlichen Killerzellen mit aktivierten hepatischen Sternzellen**

**DISSERTATION**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Andreas Glässner**

aus Bonn

Bonn, 2013

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Jacob Nattermann

2. Gutachter: Prof. Dr. Sven Burgdorf

Datum der Promotion: 15.11.2013

Erscheinungsjahr: 2013

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Die Hepatitis C-Virus-Infektion .....	1
1.1.1. Das Hepatitis C-Virus .....	2
1.1.2. Therapie.....	2
1.2. Koinfektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus .....	3
1.2.1. Die HIV-Infektion /AIDS .....	3
1.2.2. Das humane Immundefizienz-Virus.....	3
1.2.3. Einfluss einer HIV-Infektion auf die HCV-Infektion .....	4
1.3. Hepatische Sternzellen .....	5
1.4. Natürliche Killerzellen.....	6
1.4.1. Regulation der NK-Zell-Funktion .....	7
1.4.2. Einfluss einer HCV-Infektion auf NK-Zellen .....	8
1.4.3. Anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen.....	9
1.5. CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	9
1.6. Zytokine .....	10
1.6.1. Interleukin-2 .....	10
1.6.2. Interferon- $\alpha$ .....	11
1.7. Apoptose.....	11
1.8. Ziele der Arbeit .....	13
<b>2. Material.....</b>	<b>14</b>
2.1. Geräte .....	14
2.2. Patienten .....	14
2.3. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien .....	18
2.4. Antikörper.....	19
2.5. Zytokine .....	20
2.6. Kits .....	21
2.7. Puffer und Medien.....	21

<b>3. Methoden</b>	<b>23</b>
3.1. Zellkultur	23
3.1.1. Kultivierung von primären aktivierten humanen hepatischen Sternzellen	23
3.1.2. Kultivierung von PBMC, NK-Zellen und CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	23
3.1.3. Kultivierung von LX-2 Zellen	23
3.1.4. Markierung von hepatischen Sternzellen mit Carboxyfluorescein succinimidyl ester oder Cell Proliferation Dye e670	23
3.1.5. Stimulation von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen mit CD3/CD28-gekoppelten Beads	24
3.1.6. Stimulation von NK-Zellen mit CD4 <sup>+</sup> T-Zell Überstand	24
3.1.7. Koinkubation von hepatischen Sternzellen mit NK-Zellen	24
3.2. Zellbiologische Methoden	25
3.2.1. Isolierung von peripheren mononukleären Zellen mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation nach Böyum	25
3.2.2. Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer	26
3.3. Immunologische Methoden	26
3.3.1. Immunmagnetische Isolation von CD4 <sup>+</sup> T- oder NK-Zellen aus PBMCs	26
3.3.2. Degranulations-Assay (CD107a)	27
3.3.3. Apoptose-Assays	28
3.3.4. Intrazelluläre Färbungen von IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ in NK-Zellen	30
3.3.5. Nachweis IL-2 positiver CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach CD3/CD28 Stimulation	31
3.3.6. Durchflusszytometrie	31
3.3.7. Immunfluoreszenzfärbungen	32
3.4. Molekularbiologische Methoden	33
3.4.1. RNA-Extraktion	33
3.4.2. Quantifizierung von RNA	34
3.4.3. Reverse Transkription	34
3.4.4. Quantitative Echtzeit-PCR	34
3.5. Statistische Methoden	35
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>37</b>
4.1. Charakterisierung der primären hepatischen Sternzellen	37
4.2. Vergleich von LX-2 Zellen mit primären aktivierten hepatischen Sternzellen	39

4.3.	Einfluss einer HCV-Infektion auf die Interaktion von NK-Zellen mit primären aktivierten hepatischen Sternzellen.....	41
4.3.1.	Koinkubation von peripheren NK-Zellen mit hepatischen Sternzellen.....	41
4.3.2.	Untersuchung von NK-Zellen aus Lebertransplantaten .....	43
4.3.3.	Die <i>in vitro</i> NK-Zell-Aktivität gegen HSC korreliert invers mit dem Fibrosestatus. ....	45
4.3.4.	Bei der HSC Apoptose-Induktion durch NK-Zellen spielen NKG2D, TRAIL und FasL eine wichtige Rolle.....	46
4.3.5.	Die Bedeutung von IFN- $\alpha$ auf die anti-HSC Aktivität von NK-Zellen .....	50
4.4.	Die Bedeutung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen auf die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen im Rahmen der HIV/HCV-Koinfektion .....	52
4.4.1.	Eine geringe CD4 <sup>+</sup> T-Zellzahl geht mit einer fortgeschrittenen Leberfibrose einher.....	52
4.4.2.	CD4 <sup>+</sup> T-Zellen haben eine geringe direkte anti-fibrotische Aktivität .....	53
4.4.3.	Der Überstand von CD3/CD28 aktivierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen induziert effektiv die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen .....	54
4.4.4.	CD4 <sup>+</sup> T-Zellen induzieren die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen durch IL-2 Sekretion.....	55
4.4.5.	NKG2D spielt eine entscheidende Rolle bei der CD4 <sup>+</sup> T-Zell induzierten anti-fibrotischen Aktivität von NK-Zellen.....	58
4.4.6.	CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus HIV/HCV-koinfizierten Patienten induzieren weniger effektiv die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen .....	62
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>65</b>
5.1.	Charakterisierung der primären aktivierten hepatischen Sternzellen.....	65
5.2.	Vergleich von LX-2 Zellen mit primären aktivierten hepatischen Sternzellen....	65
5.3.	Einfluss einer HCV-Infektion auf die Interaktion von NK-Zellen mit primären aktivierten hepatischen Sternzellen.....	66
5.4.	Die Bedeutung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen auf die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen im Rahmen der HIV/HCV-Koinfektion .....	72
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>76</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>89</b>

<b>8. Veröffentlichungen.....</b>	<b>93</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>97</b>

### Zusammenfassung

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass natürliche Killerzellen (NK)-Zellen in der Lage sind, durch Apoptose-Induktion in aktivierten hepatischen Sternzellen anti-fibrotisch zu wirken. Allerdings blieb die Rolle von humanen NK-Zellen bei der Fibroseprogression weiterhin unklar. Darüber hinaus fehlen Untersuchungen, in wieweit sich eine Hepatitis C-Virus (HCV)-Infektion auf die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen auswirkt, obwohl Infektionen mit HCV zu den häufigsten Ätiologien einer Leberfibrose gehören. Um dies zu klären, wurden NK-Zellen aus gesunden Spendern und HCV-Patienten mit primären aktivierten hepatischen Sternzellen koinkubiert und anschließend der Anteil der apoptotischen Sternzellen durchflusszytometrisch mittels intrazellulärer aktiver Caspase-3 Färbung ermittelt.

Anhand dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen aus HCV-Patienten im Vergleich zu NK-Zellen aus gesunden Probanden effektiv Apoptose in primären aktivierten hepatischen Sternzellen auslösen. Dabei korrelierte die anti-fibrotische NK-Zell-Aktivität invers mit dem Fibrosegrad des Patienten, da NK-Zellen aus HCV-Patienten mit einer geringen Leberfibrose deutlich effektiver Apoptose in hepatischen Sternzellen induzierten als NK-Zellen aus Patienten mit einer fortgeschrittenen Fibrose. Zusätzlich ergaben Blockierungsexperimente eine wichtige Rolle von NKG2D, TRAIL und FasL bei der NK-Zell-vermittelten Apoptose-Induktion in hepatischen Sternzellen, wobei weitere Faktoren involviert sein dürften. Zudem induzierten NK-Zellen aus Interferon- $\alpha$  therapierten Patienten am effizientesten Apoptose in hepatischen Sternzellen. Im Einklang mit dieser Beobachtung führte die *in vitro* Stimulation von NK-Zellen mit rekombinantem Interferon- $\alpha$  zu einer gesteigerten anti-fibrotischen NK-Zell-Aktivität, die durch eine Hochregulation von TRAIL vermittelt wurde.

Somit konnte nachgewiesen werden, dass auch humane NK-Zellen eine anti-fibrotische Aktivität besitzen und eine wichtige Rolle bei der Modulation der HCV-induzierten Leberfibrogenese spielen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer HIV/HCV-Koinfektion auf die Fibroseprogression untersucht, da infolge der zusätzlichen HIV-Infektion die HCV-induzierte Leberfibrose bei diesen Patienten deutlich schneller voranschreitet als bei HCV-

monoinfizierten Patienten. In diesem Zusammenhang deckten eine ganze Reihe von epidemiologischen Studien auf, dass eine geringe CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl mit einem fortgeschrittenen Fibrorestadium assoziiert ist. Des Weiteren entwickelt sich die Fibrose bei Patienten mit niedrigen CD4<sup>+</sup> T-Zellzahlen deutlich schneller, als bei Patienten mit einer physiologisch normalen CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl. Allerdings war bisher völlig unklar, welche Rolle die CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der Modulation der Leberfibrose einnehmen.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden NK-Zellen mit dem Überstand von CD3/CD28 aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen stimuliert und anschließend mit primären aktivierten hepatischen Sternzellen koinkubiert. Die nachfolgende Analyse der apoptotischen Sternzellen ergab, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lage sind, über eine IL-2 abhängige Hochregulation von NKG2D, die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen zu stimulieren. Darüber hinaus wurde beim Vergleich von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus gesunden und HCV-infizierten Probanden eine gestörte IL-2 Sekretion bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen infolge einer HIV/HCV-Koinfektion beobachtet, die *in vitro* mit einer verminderten Stimulation der anti-fibrotischen NK-Zell-Aktivität einherging.

Daher könnte der HIV-assoziierte Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie die reduzierte IL-2 Sekretion zu einer beschleunigten Fibroseprogression bei einer HIV/HCV-Koinfektion beitragen. Außerdem konnte damit erstmalig eine mögliche Erklärung geliefert werden, warum die CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl mit der Fibroseprogression bei einer HIV/HCV-Koinfektion assoziiert ist.



## 1. Einleitung

### 1.1. Die Hepatitis C-Virus-Infektion

Seit der Erstbeschreibung des Hepatitis C-Virus (HCV) im Jahre 1989 als Erreger einer non-A, non-B Hepatitis ist das Virus zunehmend als ein globales Gesundheitsproblem erkannt worden<sup>1</sup>. Die WHO geht mittlerweile davon aus, dass 130 - 180 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C-Virus infiziert sind<sup>2</sup>. Wie der Name bereits andeutet zeichnet sich eine Infektion mit dem Hepatitis C-Virus durch eine Entzündung der Leber aus, da hauptsächlich Hepatozyten von dem Virus infiziert und zur Replikation genutzt werden.

Die Transmission des Hepatitis C-Virus erfolgt in den meisten Fällen durch parenteralen Blutkontakt infolge von verunreinigten Bluttransfusionen oder durch die Verwendung von kontaminierten Spritzen bei Drogenkonsum. Mit der Einführung des HCV-Screenings bei Blutspenden Anfang der 90er Jahre ist eine Transfusions-assoziierte Neuinfektion in Deutschland aber mittlerweile sehr selten. Darüber hinaus zählt eine sexuelle Transmission, die bevorzugt bei MSM (*engl. men who have sex with men*) auftritt, zu den wichtigen Übertragungswegen. Allerdings bleibt in vielen Fällen die Ursache der Neuinfektion unbekannt<sup>3</sup>.

Die ersten Wochen nach einer Infektion mit dem Hepatitis C-Virus sind meist mit grippeähnlichen Symptomen assoziiert oder verlaufen sogar komplett ohne Beschwerden. In dieser „akuten“ Phase der HCV-Infektion entscheidet sich, ob das wirtseigene Immunsystem in der Lage ist, das Virus zu eliminieren oder ob die Infektion einen „chronischen“ Verlauf annimmt. Dabei wird von einer chronischen HCV-Infektion gesprochen, wenn sechs Monate nach der Neuinfektion weiterhin Viren im Blut des Patienten nachgewiesen werden können<sup>4</sup>. Im Allgemeinen zeichnet sich eine HCV-Infektion durch eine hohe Chronifizierungsrate aus. So ist bei 50 - 80 % der akuten HCV-Patienten mit einem chronisch Verlauf der Infektion zu rechnen<sup>5,6</sup>.

Ebenso wie in der akuten Phase verläuft die chronische HCV-Infektion in den ersten Jahren meist ohne größere Beschwerden für den Patienten. Allerdings führt die dauerhafte Entzündungsreaktion infolge der HCV-Infektion zu einem kontinuierlichen fibrotischen Umbau der Leber, so dass die Patienten nach 10 - 25 Jahren eine

Leberzirrhose entwickeln können<sup>7</sup>. Treten neben der HCV-Infektion weitere Risikofaktoren wie übermäßiger Alkoholkonsum, fortgeschrittenes Alter, männliches Geschlecht oder eine Koinfektion mit HIV oder HBV auf, führt dies zu einer deutlich schnelleren Fibroseprogression<sup>6</sup>. Außerdem steigt das Risiko für ein hepatozelluläres Karzinom (HCC), je länger die HCV-Infektion persistiert<sup>8</sup>. In beiden Fällen kommt es mit der Zeit zu einem kompletten Leberversagen, dessen einzige klinische Behandlungsoption eine Lebertransplantation ist<sup>9</sup>.

### **1.1.1. Das Hepatitis C-Virus**

Das Hepatitis C-Virus ist ein 50 nm großes, behülltes Virus mit einer Einzelstrang-RNA als Genom. Es gehört zur Familie der Flaviviridae innerhalb der Gattung Hepacivirus<sup>10,11</sup>. Aufgrund der genetischen Instabilität des RNA-Genoms lassen sich 6 Genotypen des Hepatitis C-Virus unterscheiden, die weiterhin in mindestens 30 Subtypen unterteilt werden können<sup>12,13</sup>. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Genotypen hinsichtlich der geografischen Verteilung<sup>14</sup>. So ist in Deutschland besonders der Genotyp 1 vertreten, der durch eine hohe Chronifizierungsrate und ein schlechtes Therapieansprechen gekennzeichnet ist<sup>15-17</sup>.

### **1.1.2. Therapie**

Im Gegensatz zu einer Hepatitis A- oder B-Infektion steht für die Hepatitis C-Infektion keine Impfung als präventive Maßnahme zur Verfügung.

Zur Behandlung einer HCV-Infektion hat sich seit vielen Jahren eine Kombinationstherapie aus pegyliertem Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) und Ribavirin (RBV) durchgesetzt, deren Therapieerfolg aber stark vom HCV-Genotyp abhängt und häufig mit starken Nebenwirkungen verbunden ist<sup>15,16</sup>. Darüber hinaus sind seit kurzem Protease-Inhibitoren auf dem Markt, deren Wirkung auf der spezifischen Hemmung der HCV-Protease beruhen und in Form einer Triple-Therapie mit IFN- $\alpha$  und RBV verabreicht werden<sup>18</sup>. Interessanterweise führen weder eine spontane Ausheilung noch ein erfolgreiches Therapieansprechen zu einer protektiven Immunisierung, so dass eine erneute Infektion mit HCV möglich ist.

## **1.2. Koinfektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus**

Unter den weltweit 40 Millionen HIV-Infizierten gibt es schätzungsweise 5 - 7 Millionen Menschen, die eine Koinfektion mit dem Hepatitis C-Virus aufweisen. Aufgrund der gemeinsamen Transmissionswege von HCV und HIV sind vor allem Drogenkonsumenten, Hämophilie-Patienten und Empfänger von Bluttransfusionen von einer HIV/HCV-Koinfektion betroffen<sup>19-21</sup>. Im Gegensatz zu HCV wird HIV aber in den meisten Fällen durch ungeschützten Sexualkontakt übertragen.

### **1.2.1. Die HIV-Infektion /AIDS**

Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) wurde 1983 als Auslöser der erworbenen Immunschwäche AIDS (*engl. acquired immune deficiency syndrome*) identifiziert, die bereits zwei Jahre zuvor bei einer Gruppe homosexueller Männer beschrieben wurde<sup>22,23</sup>. Das Virus befällt insbesondere CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, da es das CD4 Molekül als Rezeptor zum Eintritt in die Zelle nutzt<sup>24,25</sup>. Durch den Verlust der für die adaptive Immunantwort essentiellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen kommt es zu der erworbenen Immunschwäche AIDS, die durch eine Reihe von opportunistischen Infektionen in Erscheinung tritt. Allerdings ist AIDS durch eine lange Latenzzeit charakterisiert, so dass im Durchschnitt elf Jahre vergehen, bis es zu einem Ausbruch der Erkrankung kommt<sup>26</sup>.

Mit der Einführung der ersten Medikamente gegen HIV Ende der 80iger Jahre gelang es, die Überlebenszeit der HIV-Patienten kontinuierlich zu steigern. Mittlerweile stehen eine ganze Reihe von verschiedenen Medikamenten zur Verfügung, die in Form einer Kombinationstherapie verabreicht werden und als ART (antiretrovirale Therapie) oder HAART (hoch aktive antiretrovirale Therapie) bezeichnet werden.

### **1.2.2. Das humane Immundefizienz-Virus**

Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist von einer Lipoproteinhülle umgeben und hat einen Durchmesser von 100 - 120 nm. Es gehört zur Familie der Retroviren innerhalb der Gattung der Lentiviren und besitzt ein Genom aus zwei Einzelstrang-RNA Molekülen. Mit Hilfe der reversen Transkriptase, die charakteristisch für alle Retroviren ist, werden die RNA-Einzelstränge in DNA umgeschrieben, die dann in das Wirtsgenom integriert werden<sup>27</sup>.

Aufgrund von genomischen Unterschieden lassen sich zwei Subtypen des HI-Virus unterscheiden, die als HIV-1 und HIV-2 bezeichnet werden und in weitere Untergruppen unterteilt werden können<sup>28,29</sup>. Allerdings ist HIV-1 virulenter und macht daher den Großteil der weltweiten Infektionen aus<sup>30</sup>.

### **1.2.3. Einfluss einer HIV-Infektion auf die HCV-Infektion**

Eine Koinfektion mit HIV scheint jede Phase einer HCV-Infektion negativ zu beeinflussen<sup>31</sup>. So fanden viele Studien eine erhöhte HCV-Viruslast bei Patienten mit einer HIV-Koinfektion<sup>32,33</sup>, dessen Ursache in einer längeren Halbwertszeit der HCV-Virionen durch eine reduzierte Immunantwort infolge der HIV-Infektion liegen könnte<sup>31</sup>. Damit einhergehend konnten Patienten mit einer HIV-Infektion eine zusätzliche HCV-Infektion weniger häufig spontan ausheilen als Patienten mit einer HCV-Monoinfektion<sup>34,35</sup>.

Besonders auffallend ist allerdings die beschleunigte Progression der Leberfibrose die bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten beobachtet wird<sup>36–38</sup>. So vergehen bei einer HCV-Monoinfektion im Durchschnitt 23 Jahre, bis der Patient eine Leberzirrhose entwickelt, während eine Koinfektion mit HIV diesen Zeitraum auf 7 Jahre verkürzt<sup>39</sup>. Darüber hinaus steigt das Risiko für ein hepatozelluläres Karzinom<sup>40</sup>. Als Ursachen für die raschere Fibroseprogression bei einer HIV/HCV-Koinfektion kommen verschiedene Faktoren in Frage. Zum einen scheint HIV eine direkte pro-fibrotische Wirkung zu besitzen, da es in der Lage ist, hepatische Sternzellen zu infizieren. Diese produzieren daraufhin vermehrt Kollagen I und schütten pro-inflammatorische Zytokine aus, wodurch die beschleunigte Fibroseprogression infolge einer Koinfektion mit HIV erklärt werden könnte<sup>41–43</sup>. Zum anderen scheint die HIV-assoziierte Immunsuppression aufgrund des CD4<sup>+</sup> T-Zell-Verlustes ebenfalls eine entscheidende Rolle zu spielen. Eine ganze Reihe von epidemiologischen Studien fand heraus, dass eine niedrige CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten mit einem fortgeschrittenen Fibrosegrad assoziiert ist. Zusätzlich entwickelt sich die Fibrose bei Patienten mit niedrigen CD4<sup>+</sup> T-Zellzahlen deutlich schneller, als bei Patienten mit höheren CD4<sup>+</sup> T-Zellzahlen<sup>38,44–52</sup>.

### 1.3. Hepatische Sternzellen

Hepatische Sternzellen wurden bereits im Jahre 1876 von Karl Wilhelm Kupffer als Vitamin A speichernde Zellen beschrieben und waren lange Zeit unter den Synonymen Ito-Zellen, Lipozyten, perisinusoidale Zellen oder Fettspeicherzellen bekannt, bevor man sich auf den Begriff „hepatische Sternzellen“ einigte<sup>53</sup>. Allerdings rückten die Sternzellen erst vor knapp 25 Jahren in den Fokus der Wissenschaft, da man erkannte, welche vielfältigen Funktionen diese Zellen in der Leber ausüben<sup>54</sup>.

Hepatische Sternzellen (HSC) sind mesenchymale Zellen, die in dem sub-endothelialen Raum (auch Disseschen Raum), zwischen der basolateralen Oberfläche der Hepatozyten und der anti-luminalen Seite von sinusoidalen endothelialen Zellen, liegen (siehe Abbildung 1) und etwa 3 – 6 % der hepatischen Zellen ausmachen<sup>55,56</sup>.

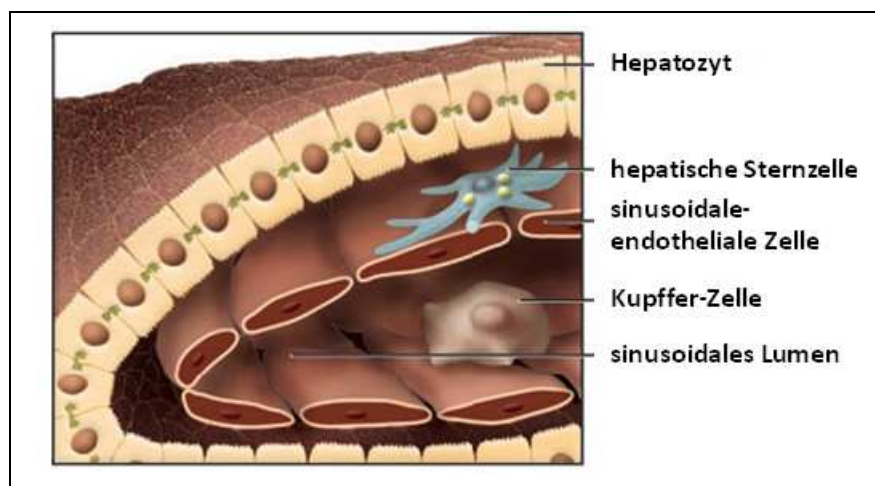


Abbildung 1 zeigt die Lokalisation von hepatischen Sternzellen in der Leber (verändert nach Bataller und Brenner)<sup>57</sup>.

Die Hauptfunktionen von HSC in der gesunden Leber umfassen die Speicherung von Vitamin A in Form von charakteristischen zytoplasmatischen Tröpfchen<sup>58</sup> sowie der Regulation des hepatischen Blutflusses<sup>59</sup> und der Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix<sup>60</sup>. Dieser ruhende Zustand bleibt so lange bestehen, bis die HSC aufgrund einer Verletzung der Leber in einen aktivierten, Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp differenzieren. Dabei stellen die häufigsten Ursachen für eine Leberschädigung chronische Entzündungsreaktionen dar, die infolge von Alkoholmissbrauch, Viruserkrankungen wie Hepatitis B oder C, einer Fettleber oder metabolischen Störungen auftreten<sup>61</sup>.

Durch die Aktivierung der HSC kommt es zu einer ganzen Reihe von phänotypischen Veränderungen. Dazu zählen insbesondere eine starke Proliferations- und Kontraktionskapazität sowie der Verlust des Vitamin A. Darüber hinaus sezernieren aktivierte HSC große Mengen an Kollagen, Matrixmetalloproteinasen (MMP) sowie TIMPs (*engl. tissue inhibitors of metalloproteinases*), so dass es zu einem Umbau der extrazellulären Matrix innerhalb der Leber kommt<sup>57,61,62</sup>. Aufgrund dieser Eigenschaften werden aktivierte HSC als eine der Hauptursache für die Entstehung einer Leberfibrose/-zirrhose angesehen, da durch die exzessive Ablagerung von Kollagen und dem Umbau der extrazellulären Matrix die ursprüngliche Leberarchitektur mit der Zeit komplett zerstört wird<sup>63</sup>. Dieser Prozess ist allerdings bis zu einem gewissen Grad reversibel, sobald die Ursache der Leberschädigung beseitigt wurde. Es wird angenommen, dass durch Apoptose-Induktion in aktivierten HSC sowie die Rückkehr von aktivierten HSC in den ruhenden Zustand die übermäßige Produktion von Kollagen gestoppt wird, so dass die Leber regenerieren kann<sup>54,64,65</sup>.

### 1.4. Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wurden erstmals im Jahre 1975 als Zellen des angeborenen Immunsystems beschrieben, deren Aufgabe im Abtöten von Tumor- sowie Virus-infizierten Zellen besteht<sup>66,67</sup>. Seitdem sind eine ganze Reihe weiterer NK-Zell-Funktionen entdeckt worden, wobei die Immunregulation durch Zytokinsekretion besonders hervorzuheben ist.

Im Menschen machen NK-Zellen 5 – 20 % der peripheren Blutlymphozyten aus. Allerdings findet man in manchen Organen eine starke Akkumulation von NK-Zellen, so dass z.B. in der Leber bis zu 50 % der Lymphozyten NK-Zellen sind<sup>68</sup>.

NK-Zellen werden gewöhnlich anhand der CD56-Expression und dem Fehlen des CD3-Moleküls von den anderen Zellen der Lymphozytenpopulation unterschieden<sup>69,70</sup>. Die CD56(+), CD3(-) NK-Zellen werden dabei weiterhin in zwei Subpopulationen unterteilt, den CD56<sup>bright</sup> und den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Allerdings gibt es einige Studien, die neben CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> noch eine dritte NK-Zell-Population beschreiben, die durch ein Fehlen der CD56-Expression gekennzeichnet ist und daher als CD56<sup>neg</sup> bezeichnet wird<sup>71</sup>. Diese Subpopulation findet man vor allem bei Patienten mit einer chronischen Viruserkrankung wie HIV oder HCV, während CD56<sup>neg</sup> NK-Zellen in gesunden Menschen

nur in sehr geringem Umfang vorkommen<sup>72–74</sup>. Dennoch beschränken sich die meisten Studien auf die klassische Einteilung in CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen, da bisher eine genaue Definition der CD56<sup>neg</sup> NK-Zellen fehlt<sup>75</sup>.

Neben der unterschiedlichen CD56-Expression variieren die beiden Subpopulationen auch hinsichtlich ihrer Eigenschaften und Funktionen. So stellen CD56<sup>bright</sup> Zellen mit 10 % den weitaus kleineren Anteil peripheren NK-Zellen dar, wohingegen 90 % der NK-Zellen den CD56<sup>dim</sup> Phänotypen besitzen<sup>76,77</sup>. Dabei wird angenommen, dass die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen den unreiferen Phänotypen besitzen und im Laufe der Zeit in CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen differenzieren<sup>78</sup>.

Im Allgemeinen wird die Hauptfunktion von unstimulierten CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Immunregulation durch Zytokinsekretion gesehen, während CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen eher ein zytotoxisches Potential aufweisen<sup>78</sup>. Allerdings zeigte sich schnell, dass diese einfache Betrachtungsweise der komplexen NK-Zell-Antwort nicht gerecht wird, da Zytokine oder die Art der Zielzelle einen enormen Einfluss auf die Funktionen von CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen haben. So führt die Behandlung mit IL-2 beispielsweise zu einer stärkeren zytotoxischen Reaktion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, da diese konstitutiv den hochaffinen IL-2 Rezeptor exprimieren, während die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen den intermediäraffinen IL-2 Rezeptor besitzen und daher weniger stark durch IL-2 aktiviert werden<sup>79,80</sup>.

### 1.4.1. Regulation der NK-Zell-Funktion

Die Regulation der NK-Zell-Funktionen erfolgt durch eine Reihe unterschiedlicher inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren, die auf der Oberfläche exprimiert werden. Zu den wichtigsten inhibitorischen Rezeptoren zählen die KIRs (*engl. killer cell immunoglobulin like receptors*) und NKG2A, welche die klassischen bzw. nicht klassischen MHC-I Moleküle wie HLA-E auf einer Zelle erkennen<sup>81</sup>. Allerdings liefern die KIRs aktivierende Signale an die NK-Zelle, wenn eine Zielzelle wenige oder keine MHC-I Moleküle besitzt, wie es bei Tumorzellen oder Virus-infizierten Zellen häufig der Fall ist. Dieses Phänomen wurde als „missing self“ Hypothese bekannt und führt zum Abtöten der Zielzelle<sup>82</sup>.

Die bekanntesten aktivierenden Rezeptoren umfassen die NCRs (*engl. natural cytotoxicity receptor*), wie NKp30, NKp44 oder NKp46 sowie die zur Gruppe der Lektin-ähnlichen Rezeptoren gehörenden NKG2D und NKG2C. Dabei sind die Liganden der NCRs

vielfältig und teilweise noch unbekannt, während NKG2D an die auch als Stressliganden bekannten ULBP1-6 (UL16 bindendes Protein 1-6) und MICA bzw. MICB bindet. Darüber hinaus besitzen 90 % der NK-Zellen den Fcγ-Rezeptor III (CD16), der den Fc-Teil von gebundenen Antikörpern erkennt und zu einer Aktivierung der NK-Zellen führt. Dieser Mechanismus wird als ADCC (*engl. antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) bezeichnet<sup>81,83,84</sup>.

Die Entscheidung, ob eine NK-Zelle aktiviert wird, hängt daher von der Liganden-zusammensetzung auf der Oberfläche der Zielzelle ab. Überwiegen die aktivierenden Signale werden Granzym und Perforin von der NK-Zelle sezerniert, die in zytotoxischen Granula gespeichert sind. Dabei permeabilisiert Perforin die Plasmamembran der Zielzelle, so dass die Granzym-Enzyme in die Zelle gelangen können, um dort den Apoptoseprozess durch proteolytische Spaltung der Procaspasen einzuleiten. Des Weiteren werden Zytokine wie Interferon-γ oder TNFα von der NK-Zelle freigesetzt<sup>83</sup>.

Neben dem Perforin/Granzym vermittelten Mechanismus können NK-Zellen aber auch über den extrinsischen Signalweg den Apoptoseprozess in Zellen initiieren. So bewirkt die Stimulation mit IFN-α, dass NK-Zellen den Todesliganden TRAIL (*engl. TNF-related apoptosis-inducing ligand*) hochregulieren<sup>85</sup>. Dadurch können NK-Zellen Apoptose in den Zellen induzieren, die den TRAIL-Rezeptor I oder II besitzen<sup>86</sup>. Zusätzlich können weitere Todesliganden wie FasL nach Zytokinstimulation exprimiert werden<sup>87</sup>.

### **1.4.2. Einfluss einer HCV-Infektion auf NK-Zellen**

Im Allgemeinen beschränken sich Studien über den Einfluss einer HCV-Infektion auf den NK-Zell-Phänotyp und die Funktion in der chronischen Phase einer HCV-Infektion, da der genaue Zeitpunkt der Ansteckung infolge der meist unspezifischen Symptome unbekannt ist und gewöhnlich länger zurück liegt. Allerdings sind auch Studien über NK-Zellen in der chronische HCV-Infektion dahingehend limitiert, das größtenteils periphere NK-Zellen untersucht werden, während Daten zu intrahepatischen NK-Zellen aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von humanem Lebergewebe selten sind.

Die bisherigen Studien deckten dabei eine ganze Reihe von funktionellen und phänotypischen Veränderungen bei NK-Zellen infolge einer HCV-Infektion auf, die allerdings teilweise sehr kontrovers diskutiert werden<sup>88,89</sup>. So fanden die meisten Untersuchungen bei der Analyse von peripheren NK-Zellen, dass eine HCV-Infektion zu einer



gesteigerten NK-Zell-Zytotoxizität führt, die wahrscheinlich durch IFN- $\alpha$  und weitere Zytokine vermittelt wird, welche von HCV-infizierten Hepatozyten sezerniert werden<sup>90–93</sup>. Im Gegensatz dazu wurde eine verringerte IFN- $\gamma$  Sekretion bei NK-Zellen aus HCV-infizierten Patienten beobachtet. Da IFN- $\gamma$  wichtig für die Hemmung der Virusreplikation ist, könnte dies eine Erklärung sein, dass trotz gesteigerter NK-Zell-Zytotoxizität die HCV-Infektion nicht erfolgreich bekämpft werden kann<sup>91,94</sup>. Allerdings zeigt eine aktuelle Studie eine verminderte intrahepatische NK-Zell-Zytotoxizität und TRAIL-Expression bei einer HCV-Infektion<sup>95</sup>.

Neben der phänotypischen Veränderungen führt eine HCV-Infektion auch zu einer Abnahme der intrahepatischen NK-Zell-Frequenz, die umso stärker ausfällt, je weiter die Leberfibrose fortgeschritten ist<sup>96,97</sup>.

### **1.4.3. Anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen**

Die Bedeutung von NK-Zellen bei der Fibroseprogression konnte erstmals im Mausmodell nachgewiesen werden, wo NK-Zellen durch Apoptose-Induktion in aktivierten HSC anti-fibrotisch wirkten. Dabei spielten der aktivierende NK-Zell-Rezeptor NKG2D, der Todesligand TRAIL sowie IFN- $\gamma$  eine entscheidende Rolle<sup>98–104</sup>. Allerdings waren die NK-Zellen nur in der Lage, früh aktivierte HSC abzutöten, während in ruhenden und voll aktivierten HSC keine Apoptose induziert wurde. Dies könnte mit dem Abbau des Vitamin A im Zusammenhang stehen, da hierdurch die Expression der NKG2D-Liganden REA-1 (*engl. retinoic acid inducible gene 1*) induziert wird. Durch den Verlust des Vitamin A wird auf voll aktivierten HSC kein REA-1 exprimiert, so dass die NK-Zellen nicht mehr aktiviert werden<sup>101</sup>.

Eine anti-fibrotische Aktivität für humane NK-Zellen konnte etwas später nachgewiesen werden. In Koinkubationsversuchen mit primären aktivierten HSC waren humane NK-Zellen ebenfalls in der Lage, Apoptose induzieren<sup>93,105–108</sup>.

### **1.5. CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder auch T-Helferzellen sind Teil des adaptiven Immunsystems und stellen mit 30 – 50 % die größte Population der peripheren Blutlymphozyten dar. Zusammen mit den zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen machen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen den Großteil aller T-Zellen aus, welche im Thymus heranreifen und den T-Zell-Rezeptor exprimieren.

Dieser dient zur Erkennung von Antigenen, die durch den MHC-Komplex präsentiert werden. Aufgrund der somatischen Rekombination besitzt jede T-Zelle einen anderen T-Zell-Rezeptor, der ein Antigen spezifisch bindet.

Wie der Name bereits andeutet, spielen T-Helferzellen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, da sie diese auf entscheidende Weise modulieren können. So unterstützen  $CD4^+$  T-Zellen die Antikörpersynthese in B-Zellen, induzieren eine starke antimikrobielle Antwort bei Makrophagen, locken Eosinophile, Neutrophile und Basophile zum Ort der Infektion und regulieren die Immunantwort mit Hilfe von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen<sup>109</sup>.

Diese vielfältigen Funktionen können allerdings nur erreicht werden, da naive  $CD4^+$  T-Zellen zu unterschiedlicher Effektorzellen differenzieren können. Bereits Mitte der 80iger Jahre wurden zwei  $CD4^+$  T-Zell-Populationen beschrieben, die verschiedene Zytokinprofile aufwiesen und als Th1- und Th2-Zellen bezeichnet wurden<sup>110,111</sup>. Dabei entscheidet neben dem Zytokinmilieu am Entzündungsort auch die Art der kostimulatorischen Faktoren, in welche Subpopulation sich die naiven  $CD4^+$  T-Zellen nach der Aktivierung differenzieren<sup>112,113</sup>.

Die Hauptfunktion von Th1 Zellen besteht darin, die Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene durch die Synthese von IFN- $\gamma$  und IL-2 zu verstärken, während Th2-Zellen für die Bekämpfung von extrazellulären Parasiten und für eine effektive B-Zell-Reaktion besonders wichtig sind und Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-10 produzieren<sup>110,114–116</sup>. Mittlerweile sind weitere Subpopulationen von  $CD4^+$  T-Zellen beschrieben worden, deren bekannteste Vertreter die Th17-Zellen und die induzierten regulatorischen T-Zellen (iTreg) sind. Die Besonderheit der iTregs ist, dass diese immunsupprimierende Funktionen besitzen und damit Autoimmunreaktionen verhindern<sup>117</sup>.

## 1.6. Zytokine

### 1.6.1. Interleukin-2

Interleukin-2 (IL-2) wurde vor mittlerweile mehr als 30 Jahren zum ersten Mal beschrieben und aufgrund der Wirkungsweise als T-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet<sup>118</sup>. Das 15,4 kDa große Protein wird dabei hauptsächlich von aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen und in

geringerem Umfang von aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen produziert. Daneben gelten aktivierte dendritische Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen als Quelle von IL-2<sup>119</sup>.

Das Wirkungsspektrum von IL-2 umfasst eine ganze Reihe von verschiedenen Zelltypen, zu denen T-Zellen aber auch NK-Zellen gehören. Bei aktivierten T-Zellen sorgt IL-2 für eine starke Proliferation und dient als Überlebenssignal, während NK-Zellen ebenfalls mit einer vermehrten Zellteilung auf IL-2 reagieren. Darüber hinaus führt die Behandlung mit IL-2 zu einer Aktivierung der NK-Zellen, so dass diese zytotoxischer auf Zielzellen reagieren<sup>79,120,121</sup>.

### 1.6.2. Interferon- $\alpha$

Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) gehört zusammen mit IFN- $\beta$  zu den Typ 1 Interferonen, die bereits im Jahre 1957 entdeckt wurden und aufgrund der Fähigkeit, die virale Replikation zu beeinträchtigen (*engl. to interfere*), als Interferon bezeichnet wurden<sup>122</sup>. Neben der anti-viralen Wirkung aktiviert IFN- $\alpha$  aber auch Zellen des Immunsystems, zu denen T-, B- und NK-Zellen gehören<sup>123</sup>. Die Synthese von IFN- $\alpha$  wird durch die Bindung von konservierten pathogenen Strukturen an bestimmte Rezeptoren den PRRs (*engl. pattern recognition receptor*) induziert. Dabei sind fast alle humanen Zelltypen in der Lage, Typ I Interferone zu bilden<sup>124</sup>.

### 1.7. Apoptose

Der Begriff „Apoptose“ wurde erstmals im Jahr 1972 von Kerr und Kollegen benutzt, um das Phänomen des programmierten Zelltodes zu beschreiben, der bei einer ganzen Reihe von verschiedenen physiologischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielt. Durch den programmierten Zelltod lassen sich überflüssige Zellen entfernen, um die Zellhomöostase aufrecht zu erhalten oder um während der Embryogenese bestimmte Strukturen wie Finger auszubilden. Des Weiteren können autoreaktive Zellen des Immunsystems oder defekte Zellen durch Apoptose eliminiert werden<sup>125</sup>.

Im Allgemeinen geht der Prozess der Apoptose mit einer Reihe von morphologischen Veränderungen einher, die zuerst eine Zellschrumpfung und Kondensation des Chromatins (Pyknose) umfassen<sup>126</sup>. Im weiteren Verlauf schnüren sich „*apoptotic bodies*“ von der Zelle ab, die aus Zytoplasma und Organellen bestehen und von Makrophagen und Parenchymzellen phagozytiert werden, so dass die Apoptose ohne Entzündungsreaktion

abläuft<sup>127,128</sup>. Dadurch wird das umliegende Gewebe nicht beschädigt. Im Gegensatz dazu führt der nicht programmierte Zelltod (Nekrose), der aufgrund starker Strahlenbelastung, Hitze oder mechanischen Verletzungen auftritt, zu einer Schädigung des umliegenden Gewebes, da die Zellen nicht abgebaut werden, sondern das Zytoplasma ungehindert freigesetzt wird<sup>129</sup>.

Neben den morphologischen Veränderungen gibt es eine Reihe von biochemischen Prozessen, die während der Apoptose initiiert werden. Eine ganz besondere Rolle nehmen dabei die Caspasen (**C**ystein abhängige **A**spartat-spezifische **P**roteasen) ein, die in der normalen Zelle in einer inaktiven Proform vorliegen und im Zuge der Apoptose durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Dabei wird zwischen Initiator-Caspasen (Caspase-2,-8,-9,-10) und Effektor-Caspasen (Caspase-3,-6,-7) unterschieden. Die Initiator-Caspasen aktivieren die Effektor-Caspasen, welche wiederum zelluläre Proteine wie z.B. PARP (poly ADP-Ribose Polymerase), ein DNA-Reparaturenzym, spalten. Zusätzlich werden weitere Enzyme wie die Endonuklease CAD durch die Effektor-Caspasen aktiviert, wodurch es zu einer Fragmentierung der DNA kommt<sup>130</sup>.

Die Apoptose-Induktion in einer Zelle kann durch drei verschiedene Signalwege erfolgen, zu denen der extrinsische, intrinsische und der Granzym/Perforin vermittelte Signalweg zählen. Bei dem extrinsischen Weg lösen bestimmte extrazelluläre Liganden, die an spezielle Transmembranrezeptoren der Zelle binden, den Apoptoseprozess aus. Diese Transmembranrezeptoren werden als Todesrezeptoren bezeichnet, deren bekannteste Vertreter die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2, der Fas-Rezeptor sowie der TNF $\alpha$ -Rezeptor 1 sind. Die korrespondierenden Liganden umfassen TRAIL, FasL und TNF $\alpha$ , die sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form vorkommen<sup>131</sup>.

Im Gegensatz zum extrinsischen Signalweg wird der intrinsische Signalweg durch eine Reihe nicht-Rezeptor-vermittelter Stimuli initiiert und beruht auf der Aktivierung von intrazellulären pro-apoptotischen Proteinen. Neben Strahlung, Toxinen, Hypoxie und Infektionen mit Viren löst auch das Ausbleiben von Wachstumsfaktoren, Hormonen oder Zytokinen den intrinsischen Signalweg aus<sup>131</sup>.

Die Apoptose-Induktion mittels Granzym/Perforin erfolgt durch NK-Zellen oder zytotoxische T-Zellen. Nach Freisetzung dieser beiden Proteine bildet das Perforin Poren in der Membran der Zielzellen, so dass das Granzym in die Zelle gelangen kann.

Dort aktiviert Granzym durch proteolytische Spaltung der Procaspasen den Apoptoseprozess<sup>131</sup>.

### 1.8. Ziele der Arbeit

Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass NK-Zellen durch Apoptose-Induktion in aktivierten hepatischen Sternzellen anti-fibrotisch wirken können<sup>98-104</sup>. Allerdings war die Rolle von humanen NK-Zellen bei der Fibroseprogression größtenteils unklar, da die bisherigen Erkenntnisse auf der immortalisierten Sternzelllinie LX-2 beruhen<sup>100,104</sup>. Ob humane NK-Zellen in der Lage sind, auch in primären Sternzellen Apoptose zu induzieren, war dagegen ungeklärt. Darüber hinaus fehlen Untersuchungen, in wieweit sich eine Hepatitis C-Infektion auf die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen auswirkt, obwohl Infektionen mit HCV zu den häufigsten Ätiologien einer Leberfibrose gehören. Daher sollte im ersten Teil dieser Dissertation die anti-fibrotische Aktivität von humanen NK-Zellen durch Koinkubation mit primären aktivierten hepatischen Sternzellen ermittelt werden. Des Weiteren wurde der Einfluss einer HCV-Infektion auf die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen untersucht.

Der zweite Abschnitt dieser Arbeit befasst sich dagegen mit den Auswirkungen einer HIV/HCV-Koinfektion auf die Fibroseprogression. Infolge der HIV-Koinfektion schreitet die HCV-induzierten Leberfibrose bei diesen Patienten deutlich schneller voran als bei HCV-monoinfizierten Patienten<sup>36-38</sup>. In diesem Zusammenhang deckten eine ganze Reihe von epidemiologischen Studien auf, dass eine geringe CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl mit einem fortgeschrittenen Fibrorestadium assoziiert ist. Zusätzlich entwickelt sich die Fibrose bei Patienten mit niedrigen CD4<sup>+</sup> T-Zellzahlen deutlich schneller, als bei Patienten mit einer physiologisch normalen CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl<sup>38,44-52</sup>. Allerdings war bisher völlig unklar, welche Rolle die CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der Modulation der Leberfibrose einnehmen. Daher beschäftigt sich der zweite Teil mit der Fragestellung, durch welche Mechanismen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lage sind, die Fibroseprogression zu beeinflussen und warum der HIV-assoziierte Verlust der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer schnelleren Fibrose-Entwicklung einhergeht.

## 2. Material

### 2.1. Geräte

Gerät	Hersteller
CO <sub>2</sub> -Inkubator, Serie 300, 165 l	Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Feinwaage, Micro MC5	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCanto II	BD, Heidelberg, Deutschland
Inverses Lichtmikroskop Typ DMIL	Leitz, Köln, Deutschland
Kühlzentrifuge	Beckman, München, Deutschland
LightCycler	Roche, Mannheim, Deutschland
MACS-Separator Vario für LS-Columns	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikrotom JungCM 1800	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop 1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plattenschüttler Typ MTS 2	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Stereolupe SZ 4045TR	Olympus Optical, Hamburg, Deutschland
Sterilbank BSB4A	Flow Laboratories, Meckenheim, Deutschland
Tischzentrifuge Biofuge 13	Haereus, Osterode, Deutschland
Heizblock Dri-Block DB-2A	Techne, Wertheim, Deutschland
Vortexer Vibrofix VF1	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland

### 2.2. Patienten

Für die in dieser Doktorarbeit durchgeführten Studien wurde den Patienten 20 - 35 ml heparinisiertes Vollblut durch die Hepatologische Spezialambulanz, die Gastroenterologisch-hepatologische Ambulanz und die Immunologische Ambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Bonn entnommen. Insgesamt wurden 91 HCV-monoinfizierte Patienten, 8 HIV-monoinfizierte, 42 HICV/HCV-koinfizierte Patienten und 48 gesunde Probanden in diese Doktorarbeit eingeschlossen.

Eine detaillierte Darstellung der Patientencharakteristika ist der Tabelle 2 und 3 zu entnehmen. Von allen Patienten wurde eine Einverständniserklärung zur Verwendung des Patientenmaterials zu wissenschaftlichen Versuchszwecken unterzeichnet. Des Weiteren sind die in dieser Doktorarbeit durchgeführten Studien von der Ethik-Kommission der Universität Bonn bewilligt worden.

In dieser Doktorarbeit wurden neben dem Patientenblut ebenfalls 3 Leberexplantate aus HCV-Patienten verwendet, welche im Rahmen von Organtransplantationen entnommen wurden. Diese Patienten hatten ebenfalls eine Einverständniserklärung zur Verwendung des Patientenmaterials zu wissenschaftlichen Versuchszwecken unterzeichnet. Außerdem ist die Verwendung von Leberexplantaten von der Ethik-Kommission der Universität Bonn bewilligt worden.

**Tabelle 1: Patientencharakteristika „Lebertransplantation“**

	Lebertransplantation
Anzahl	3
weiblich <sup>a)</sup>	0 (0 %)
Alter (Jahren) <sup>b)</sup>	41,3 (35 - 54)
<b>HCV-Genotypen:</b>	
Genotyp 1 <sup>a)</sup>	2 (66,6 %)
Genotyp 3 <sup>a)</sup>	1 (33,3 %)

a) Anzahl (% von Gesamtzahl); b) Mittelwert (Wertebereich)

**Tabelle 2: Patientencharakteristika zu der Studie „Interaktion von NK-Zellen mit aktivierten hepatischen Sternzellen“**

	HCV-RNA (+)	HCV unter IFN- $\alpha$ /Ribavirin Therapie	HCV-RNA (-) nach Therapie (SVR)	gesunde Kontrollen
Anzahl	33	17	6	18
weiblich <sup>a)</sup>	10 (30,3 %)	2 (11,8 %)	4 (67 %)	7 (38,9 %)
Alter (Jahren) <sup>b)</sup>	56,1 (28 - 87)	45,2 (28 - 57)	49,7 (27 - 77)	35,9 (28 - 50)
<b>Klinische Daten</b>				
ALT U/l <sup>b)</sup>	89,1 (13 - 384)	42,8 (9 - 141)	22,3 (15 - 36)	n.a. <sup>c)</sup>
AST U/l <sup>b)</sup>	72,1 (11 - 297)	34,9 (11 - 121)	18,7 (12 - 30)	n.a. <sup>c)</sup>
$\gamma$ -GT <sup>b)</sup>	105,3 (21 - 327)	51,7 (25 - 146)	29,7 (22 - 43)	n.a. <sup>c)</sup>
<b>HCV-Status</b>				
HCV-Last (x 10 <sup>5</sup> IU/ml) <sup>b)</sup>	31,3 (<0,0001 - 400)	<0,0001	<0,0001	n.a. <sup>c)</sup>
<b>HCV- Genotypen:</b>				
Genotyp 1 <sup>a)</sup>	20 (60,6 %)	10 (58,8 %)	-	-
Genotyp 2 <sup>a)</sup>	1 (3 %)	-	-	-
Genotyp 3 <sup>a)</sup>	1 (3 %)	4 (23,5 %)	-	-
Genotyp 4 <sup>a)</sup>	1 (3 %)	-	-	-
unbekannter Genotyp <sup>a)</sup>	10 (30,3 %)	3 (17,6 %)	-	-

a) Anzahl (% von Gesamtzahl); b) Mittelwert (Wertebereich); c) n.a. nicht analysiert



**Tabelle 3: Patientencharakteristika zu der Studie „CD4<sup>+</sup> T-Zellen stimulieren die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen“**

	HCV-RNA (+)	HCV-RNA (+) / HIV (+)	HIV (+)	gesunde Kontrollen
Anzahl	35	42	8	30
weiblich <sup>a)</sup>	11 (31,4 %)	5 (11,9 %)	2 (25 %)	12 (40 %)
Alter (Jahren) <sup>b)</sup>	53,3 (26 - 79)	46 (34 - 58)	49,1 (34 - 64)	32,1 (23 - 55)
<b>Klinische Daten</b>				
ALT U/L <sup>b)</sup>	100 (7 - 255)	83,2 (4 - 830)	26 (16 - 40)	n.a. <sup>c)</sup>
AST U/L <sup>b)</sup>	74,2 (18 - 213)	72,4 (18 - 394)	20 (16-24)	n.a. <sup>c)</sup>
γ-GT <sup>b)</sup>	122,3 (23 - 477)	135,2 (25 - 538)	70,6 (32 - 106)	n.a. <sup>c)</sup>
<b>HCV-Status</b>				
HCV-Last (x 10 <sup>5</sup> IU/ml) <sup>b)</sup>	17 (0,0016 - 74.7)	51.9 (3,6 - 260,8)	n.a. <sup>c)</sup>	n.a. <sup>c)</sup>
<b>HCV-Genotypen:</b>				
Genotyp 1 <sup>a)</sup>	17 (48,6 %)	17 (40,5 %)	-	-
Genotyp 2 <sup>a)</sup>	-	2 (5,8 %)	-	-
Genotyp 3 <sup>a)</sup>	3 (8,6 %)	1 (2,4 %)	-	-
Genotyp 4 <sup>a)</sup>	-	3 (7.1 %)	-	-
unbekannter Genotyp <sup>a)</sup>	15 (42,9 %)	19 (45,2 %)	-	-
<b>HIV-Status</b>				
HIV-Last (Kopien/ml)	-	<50	<50	n.a. <sup>c)</sup>
ART <sup>a)</sup>	-	42 (100 %)	8 (100 %)	-
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (Zellen/μl)	-	559 (182 - 1151)	737 (421 - 1199)	-
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (% von Lymphozyten)	-	26,1 (10 - 42)	29,3 (20 - 38)	-

a) Anzahl (% von Gesamtzahl); b) Mittelwert (Wertebereich); c) n.a. nicht analysiert

### 2.3. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Affenserum	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Ampuwa (steriles Aqua dest.)	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Aqueous Mounting Medium	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Auslaufpipette (5,10 und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rinderserum Albumin (BSA, engl. <i>bovine serum albumin</i> )	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Brefeldin A aus <i>Penicillium brefeldianum</i>	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Sigma-Aldrich, München Deutschland
CellFix Fixierlösung	BD, Heidelberg, Deutschland
Cell Proliferation Dye e670	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
DMEM mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutmanin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Dynabeads Human T-Activator	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
EDTA (Ethyldiamintetraacid)	Promega, Mannheim, Deutschland
Einmalfiltrationsgeräte	Nunc International, Wiesbaden, Deutschland
Einweg-Handschuhe	Ansell Healthcare, München, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fötales Kälberserum (FBS, engl. <i>fetal bovine serum</i> )	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ficoll-Separationsmedium	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
GolgiStop	BD, Heidelberg, Deutschland
Isopentan	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MACS-Säulen	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS-Tubes	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Maxima SYBR Green pPCR Master Mix (2x)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer-Zählkammer	Eich, Heidelberg, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
PBS (engl. <i>phosphate buffered saline</i> ) steril, ph 7,4	Apotheke der Uniklinik Bonn
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Polystyren-FACS-Röhrchen	BD, Heidelberg, Deutschland
Polypropylen-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
S-Monovette für Heparinblut, 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Sternzellmedium + Zusätze	ScienCell, Carlsbad, CA, USA
Transwell-Platten (0,4 µm Porendurchmesser)	Corning Life Science, Amsterdam, Niederlande
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Trypanblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,5 % Trypsin/0,22 % EDTA Lösung	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Zellkulturflaschen (25 ml, 75 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

## 2.4. Antikörper

Antikörper (human)	Klon	Isotyp (Maus)	Hersteller
BrdU-FITC	k.a.	k.a.	BD, Heidelberg, Deutschland
aktive Caspase-3-PE	C92-605	Ratte IgG	BD, Heidelberg, Deutschland
CD3-PerCP	SK7	IgG1,k	Biolegend, London, UK
CD4-APC	RPA-T4	IgG1,k	BD, Heidelberg, Deutschland
CD56-APC	HCD56	IgG1,k	Biolegend, London, UK
CD107a-PE	H4A3	IgG1,k	BD, Heidelberg, Deutschland
Fas-PE	DX2	IgG1	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
FasL-FITC	Alf-2.1a	IgG1	Calbiochem, UK
IFN-γ-PE	25723	IgG2B	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
IL-2-PE	MQ1-17H12	Ratte IgG2a, k	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
MICA/B-PE	159207	IgG2A	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
MHC-I	W632	IgG2A	Uniklinik Bonn
NKG2D-PE	149810	IgG1	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
gespaltenes PARP-1-PE	HLNC4	IgG2B,k	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
TNF-α-FITC	6402	IgG1	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
TNF-Rezeptor I-PE	16803	IgG1	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
TNF-Rezeptor II-PE	22235	IgG2A	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
TRAIL-Rezeptor I-PE	69036	IgG1	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
TRAIL-Rezeptor II-PE	71908	IgG2B	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

Antikörper (human)	Klon	Isotyp (Maus)	Hersteller
TRAIL-PE	RIK-2	IgG1	BD, Heidelberg, Deutschland
ULBP-1-PE	170818	IgG2A	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
ULBP-2-PE	165903	IgG2A	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
ULBP-3	166510	IgG2A	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
<b>Blockierende Antikörper</b>			
FasL	100419	IgG2B	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
IL-2	MQ1-17H12	Ratte IgG2a,k	Biologend, London, UK
NKG2D	149810	IgG1	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
MHC-I	W632	IgG2a	Uniklinik Bonn
TRAIL	2E5	IgG1	Alexis Biochemicals, USA
<b>Antikörper für Immunhistochemie</b>			
a-SMA	1A4	IgG,k	Abcam, Cambridge, UK
aktive Caspase-3	E83-77	Kaninchen IgG	Abcam, Cambridge, UK
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
anti-Maus-NL637		Affe IgG	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
anti-Kaninchen-NL557		Affe IgG	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

## 2.5. Zytokine

Zytokine (human)	Hersteller	Dosierung
rekombinantes FasL	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland	10 - 100 ng/ml
rekombinantes IFN- $\alpha$	PBL Interferon Source, Piscataway, NJ, USA	100 - 5000 U/ml
rekombinantes IL-2	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland	12,5 - 100 U/ml
rekombinantes TRAIL	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland	10 - 100 ng/ml

## 2.6. Kits

Kits	Hersteller
APO-BRDU Kit	BD, Heidelberg, Deutschland
CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit	BD, Heidelberg, Deutschland
NK Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit	BD, Heidelberg, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

## 2.7. Puffer und Medien

### Sternzellmedium für primäre Sternzellen:

- Sternzellmedium
- 2 % FBS
- 1x Sternzellwachstumszusätze
- 10 U/ml Penicillin
- 10 µg/ml Streptomycin

### RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin für NK-Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen und PBMC:

- RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin
- 10 % FBS
- 10 U/ml Penicillin
- 10 µg/ml Streptomycin

### DMEM Medium mit 4,5 g/l Glucose und L-Glutamin für LX-2 Zellen:

- DMEM mit 4,5 g/l Glucose und L-Glutamin
- 2 % FBS
- 10 U/ml Penicillin
- 10 µg/ml Streptomycin

### MACS-Puffer zur Isolation von NK-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen:

- PBS
- 5 mM EDTA
- 2 % BSA

### Blockierungspuffer:

- PBS
- 5 % Affenserum
- 0,1 % BSA

### **3. Methoden**

#### **3.1. Zellkultur**

##### **3.1.1. Kultivierung von primären aktivierten humanen hepatischen Sternzellen**

Primäre humane hepatische Sternzellen (HSC) wurden käuflich von der Firma ScienCell erworben und bereits in einer ganzen Reihe von Studien verwendet<sup>93,105,132–134</sup>. Die Zellen entsprechen HSC in einem aktivierten Zustand.

Um die HSC zu expandieren wurden diese in Sternzellmedium aufgenommen und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Nach drei Passagen wurden die Sternzellen nochmals eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -150°C gelagert. Zwei Tage vor den jeweiligen Experimenten wurden die Sternzellen erneut aufgetaut und in Sternzellmedium kultiviert.

##### **3.1.2. Kultivierung von PBMC, NK-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

PBMC, NK-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Wie in der Arbeit an den entsprechenden Stellen gekennzeichnet, wurden die Zellen bei einigen Versuchen mit verschiedenen Dosen von IL-2 (12,5 - 100 U/ml) und IFN-α (100 - 5000 U/ml) stimuliert.

##### **3.1.3. Kultivierung von LX-2 Zellen**

Bei LX-2 Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, die durch spontane Immortalisierung aus hepatischen Sternzellen generiert wurden<sup>135</sup>. Die LX-2 Zellen wurden in DMEM-Medium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

##### **3.1.4. Markierung von hepatischen Sternzellen mit Carboxyfluorescein succinimidylester oder Cell Proliferation Dye e670**

Um die HSC nach der Koinkubation von den NK-Zellen differenzieren zu können wurden diese zuvor mit 5-Carboxyfluorescein N-Succinimidylester (CFSE) oder Cell Proliferation Dye e670 angefärbt. Beide Farbstoffe binden an zelluläre Proteine und sind somit in der Lage, jegliche Zellen zu markieren.

### Durchführung:

- HSC 16 h vor der Koinkubation mit 0,02 % EDTA-Lösung ablösen
- in 15 ml Röhrchen überführen und mit 13 ml PBS auffüllen
- bei 300 g für 10 min zentrifugieren
- Überstand abnehmen und HSC in 1 ml PBS mit 5  $\mu$ M CFSE resuspendieren
- für 10 min bei RT inkubieren
- die Reaktion mit 5 ml kaltem Sternzellmedium (+ 10 % FCS) stoppen und für 5 min inkubieren
- bei 300 g für 10 min zentrifugieren
- HSC ein weiteres mal mit 5 ml Sternzellmedium (+ 10 % FCS) waschen
- Zellzahl bestimmen und  $1,5 \times 10^4$  Zellen pro Well in 48 Well-Platte aussähen

### **3.1.5. Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit CD3/CD28-gekoppelten Beads**

Um ruhende CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren wurden diese mit Dynabeads Human T-Activator stimuliert. Dabei handelt es sich um kleine, magnetische Kügelchen die mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 gekoppelt sind. Für die verschiedenen Versuchsansätze wurden folgende Anzahl an Zellen bzw. Stimulationszeiten verwendet:

- um die Frequenz der IL-2 positiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu ermitteln wurden 200.000 PBMC für 6 h mit 4  $\mu$ l Beads stimuliert.
- um den CD4<sup>+</sup> T-Zell Überstand zur NK-Zell Stimulation zu generieren wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, 80.000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit 3  $\mu$ l Beads für 24 h stimuliert.

### **3.1.6. Stimulation von NK-Zellen mit CD4<sup>+</sup> T-Zell Überstand**

Nachdem die CD4<sup>+</sup> T-Zellen für 24 h mit CD3/CD28 gekoppelten Beads stimuliert wurden, wurden diese samt Überstand in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 400 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und unverdünnt auf die NK-Zellen gegeben.

### **3.1.7. Koinkubation von hepatischen Sternzellen mit NK-Zellen**

Die Koinkubation von hepatischen Sternzellen mit NK-Zellen wurde generell in Sternzellmedium durchgeführt. Um die NK-Zell-Aktivität zu messen, wurde nach der



Koinkubation der Anteil der CD107a (siehe Abschnitt 3.3.2.) bzw. IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  (siehe Abschnitt 3.3.4.) positiven NK-Zellen bestimmt. Außerdem wurde der Anteil der apoptotischen Sternzellen durch verschiedene Apoptose-Assays ermittelt (siehe Abschnitt 3.3.3.).

### **3.2. Zellbiologische Methoden**

#### **3.2.1. Isolierung von peripheren mononukleären Zellen mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation nach Böyum**

Zur Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus heparinisiertem Blut wurde das Verfahren nach Böyum verwendet<sup>136</sup>. Diese Methode macht sich dabei die unterschiedlichen Dichten der zellulären Bestandteile des Blutes zu nutze. Mittels einer Ficoll-Lösung, die aus einem synthetisch hergestellten Polysaccharid besteht und eine Dichte von 1,077 g/cm<sup>3</sup> besitzt, lassen sich die PBMCs von den restlichen zellulären Bestandteilen trennen. Aufgrund der höheren Dichte von Granulozyten und Erythrozyten wandern diese während der Zentrifugation durch das Ficoll hindurch, wohingegen sich Lymphozyten und Monozyten an der Grenze zur Ficoll-Lösung sammeln. Das Blutplasma sowie die Thrombozyten verbleiben dagegen im Überstand.

#### Durchführung:

- Heparinisiertes Blut 1:2 mit PBS verdünnen
- 15 ml Ficoll-Lösung in ein 50 ml Röhrchen vorlegen
- Ficoll-Lösung vorsichtig mit dem verdünnten Blut überschichten
- anschließend bei 900 g für 20 min bei RT und ausgestellter Bremse zentrifugieren
- milchige Phase (enthält PBMC) zwischen Ficoll-Lösung und Plasma vorsichtig mit einer Pasteurpipette abnehmen und in 15 ml Röhrchen überführen
- Röhrchen mit PBS auffüllen und bei 400 g für 10 min bei RT zentrifugieren
- Überstand abnehmen und PBMC in PBS resuspendieren
- bei 300 g für 10 min bei RT zentrifugieren
- Überstand abnehmen und PMBC erneut in PBS resuspendieren
- Zellzahl bestimmen

### 3.2.2. Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer und einem Lichtmikroskop lässt sich die Zellzahl ermitteln. Um die Vitalität der Zellen zu überprüfen, wurden diese mit einer Trypanblaulösung versetzt.

#### Durchführung:

- je nach Zelldichte wurden diese 1:2, 1:5 oder 1:10 mit einer 0,25 %igen Trypanblaulösung vermischt und in die Neubauer-Zählkammer gegeben
- Auszählung der lebenden Zellen (weisen keine Blaufärbung auf) in 4 Großquadraten
- Berechnung der Zellzahl nach folgender Formel:  
$$(\text{gezählte Zellen}/4) \times \text{Verdünnungsfaktor mit Trypanblau} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

### 3.3. Immunologische Methoden

#### 3.3.1. Immunmagnetische Isolation von CD4<sup>+</sup> T- oder NK-Zellen aus PBMCs

CD4<sup>+</sup> T- oder NK-Zellen wurden mit Hilfe der MACS-Separations-Technologie nach Angaben des Herstellers Miltenyi isoliert. Bei dieser Methode werden Biotin-gekoppelte Antikörper gegen verschiedenen Oberflächenmoleküle hinzugefügt, die, mit Ausnahme der Zielzellen, auf sämtlichen anderen PBMCs zu finden sind. Anschließend wird ein sekundärer Antikörper dazugegeben, der an kleine magnetische Partikel (50 nm) gebunden ist und an die Biotingruppe der primären Antikörper bindet. Die so markierten Zellen werden auf eine spezielle MACS-Säule gegeben, die in einem starken Magnetfeld platziert ist. Aufgrund der magnetischen Partikel verbleiben sämtliche markierte Zellen in der Säule, während die unmarkierten Zielzellen ungehindert durch die Säule wandern können.

#### Durchführung:

- PBMC zählen
- PBMC in MACS-Puffer (während der gesamten Isolation bei 4°C halten) resuspendieren (pro 10<sup>7</sup> PBMC 40 µl MACS-Puffer, max. 10<sup>8</sup> Zellen)
- 1. Antikörper (Biotin-gekoppelt) hinzufügen (pro 10<sup>7</sup> PBMC 10 µl Antikörper)

- 10 min bei 4°C inkubieren
- pro  $10^7$  PBMC 30 µl MACS-Puffer hinzugeben
- 2. Antikörper (anti-Biotin) hinzufügen (pro  $10^7$  PBMC 20 µl 2. Antikörper)
- 15 min bei 4°C inkubieren
- waschen mit MACS-Puffer (pro  $10^7$  PBMC 1-2 ml MACS-Puffer)
- MACS-Säule in den MACS-Separator einspannen und mit 3 ml MACS-Puffer äquilibrieren
- Zellen nach dem waschen in 500 µl MACS-Puffer aufnehmen und auf die MACS-Säule geben
- mit 3 x 3 ml MACS-Puffer die Säule waschen, vor jedem Waschschrift sollte die Säule komplett trocken laufen
- sämtlichen Durchfluss in 15 ml Röhrchen auffangen
- isolierte  $CD4^+$  T- oder NK-Zellen befinden sich nun im Durchfluss

### 3.3.2. Degranulations-Assay (CD107a)

CD107a (oder LAMP-1 für Lysosomen assoziiertes Membran-Protein-1) wird als funktioneller Marker für die NK-Zell-Aktivität verwendet<sup>137</sup> und ist in ruhenden NK-Zellen auf der Innenseite von Granula zu finden, welche neben Perforin und Granzym auch Zytokine enthalten können. Nach der Aktivierung der NK-Zelle durch eine Zielzelle verschmelzen die Granula mit der Plasmamembran, woraufhin der Inhalt der Granula in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Das CD107-Protein gelangt dadurch auf die NK-Zell-Oberfläche und lässt sich nun mit Hilfe eines Antikörpers nachweisen. Um den Abbau von CD107a durch Internalisierung mittels Endozytose zu verhindern, wird während der Koinkubation von NK-Zellen und Zielzellen GolgiStop hinzugefügt. GolgiStop enthält Monensin, welches ein Ansäuern der Endosomen und somit ein Abbau des CD107a-Moleküls verhindert.

#### Durchführung:

- NK-Zellen auf HSC geben (Verhältnis 1:1)
- 1 h bei 37°C koinkubieren
- 0,5 µl GolgiStop (1:500) und CD107a-PE (1:50) Antikörper hinzufügen

- weitere 4 h bei 37°C koinkubieren
- CD56-APC (1:40) und CD3-PerCP (1:150) Antikörper hinzufügen
- 20 min bei RT schütteln
- NK-Zellen in FACS-Röhrchen überführen und mit 4 ml PBS waschen
- für 10 min bei 300 g zentrifugieren
- Überstand abnehmen und in 100 µl CellFix aufnehmen
- Analyse mittels Durchflusszytometer

### 3.3.3. Apoptose-Assays

Zum Nachweis apoptotischer Sternzellen wurden drei verschiedene Apoptose-Assay verwendet.

#### 3.3.3.1. Caspase-3-Assay

Der in dieser Arbeit am häufigsten verwendete Apoptose-Assay (PE active Caspase-3 Apoptosis Kit, BD) beruht auf dem intrazellulären Nachweis von der aktiven Form des Caspase-3 Enzyms, welches in der normalen Zelle als Zymogen vorliegt und erst durch ein entsprechendes Apoptose-Signal aktiviert wird. Dies macht man sich bei dem Caspase-3 Assay zunutze, indem man einen Antikörper verwendet, der nur gegen die aktive Form gerichtet ist. Da es sich bei der Caspase-3 um eine Effektorcaspase handelt, die sowohl durch extrinsische als auch durch intrinsische Apoptose-Signale aktiviert werden kann, eignet sich dieser Assay gut für den Nachweis apoptotischer Zellen. Dabei spielt die Art der Apoptose-Induktion kaum eine Rolle.

#### Durchführung:

- NK-Zellen auf HSC geben (Verhältnis 10:1 oder 5:1)
- 6 h bei 37°C koinkubieren
- Überstand in FACS-Röhrchen überführen
- HSC mit Trypsin/EDTA ablösen und in das FACS-Röhrchen mit dem Überstand überführen
- 4 ml PBS hinzufügen und für 10 min bei 300 g zentrifugieren
- Überstand abnehmen und 300 µl Cytofix/Cytoperm hinzufügen
- 20 min bei 4°C inkubieren

- 2 x mit 600 µl Perm/Wasch waschen (dazwischen 10 min bei 400 g zentrifugieren)
- anti-aktive Caspase-3-PE (1:40) hinzufügen und 30 min bei 4°C inkubieren
- 2 x mit 2 ml Perm/Wash waschen (dazwischen 10 min bei 400 g zentrifugieren)
- in 100 µl CellFix aufnehmen und Analyse im Durchflusszytometer

### 3.3.3.2. PARP-Assay

Bei PARP1 (poly ADP-Ribose Polymerase 1) handelt es sich um ein DNA-Reparaturenzym, welches nach Apoptose-Induktion durch die aktiven Formen der Caspase-3, -6 oder -7 gespalten und damit inaktiviert wird. Wie beim Caspase-3 Assay nutzt man hierbei einen Antikörper, der nur an das gespaltene Fragment von PARP1 bindet.

#### Durchführung:

- siehe Durchführung in Teil 2.3.3.1 (Caspase-3 Assay) mit folgender Änderung
- anti-aktive Caspase-3-PE durch anti-gespaltene PARP-PE (1:50) ersetzen

### 3.3.3.3. TUNEL-Assay

Der TUNEL (*engl. terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labelling*)-Assay wurde mit dem „APO-BRDU Kit“ von BD durchgeführt und dient zum Nachweis von fragmentierter DNA, die während des Apoptose-Prozesses durch enzymatischen DNA-Abbau entsteht. Mit Hilfe der terminalen Deoxynukleotidtransferase werden die Enden der DNA mit Brom gekoppelten dUTPs markiert, welche im nachfolgenden Schritt durch einen Antikörper erkannt und damit nachgewiesen werden können.

#### Durchführung:

- NK-Zellen auf HSC geben (Verhältnis 10:1)
- 6 h bei 37°C koinkubieren
- HSC mit Trypsin/EDTA ablösen und in ein FACS-Röhrchen überführen
- 4 ml PBS hinzufügen und für 10 min bei 300 g zentrifugieren
- Zellen in 1 % (w/v) Paraformaldehyd resuspendieren → 30 min auf Eis
- 2 x mit 4 ml PBS waschen (bei 500 g zentrifugieren)
- Zellen in 70 % Ethanol resuspendieren → 30 min auf Eis

- 2 x mit 1 ml Wash Buffer waschen (bei 500 g zentrifugieren)
- Zellen in 50 µl DNA Labeling Solution resuspendieren → 60 min bei 37°C
- 2 x mit 1 ml Rinse Buffer waschen (bei 500 g zentrifugieren)
- Zellen in 0,1 ml Antibody Staining Solution resuspendieren → 30 min im Dunkeln bei RT
- 0,5 ml PI/RNase Staining Buffer hinzufügen → 30 min im Dunkeln bei RT
- Analyse im Durchflusszytometer

### DNA Labeling Solution:

- |                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| • Reaction Buffer                | 10 µl    |
| • TdT Enzyme                     | 0,75 µl  |
| • Br-dUTP                        | 8 µl     |
| • destilliertes H <sub>2</sub> O | 32,25 µl |

### Antibody Staining Solution:

- |                          |       |
|--------------------------|-------|
| • FITC-Labeled Anti-BrdU | 5 µl  |
| • Rinsing Buffer         | 95 µl |

### 3.3.4. Intrazelluläre Färbungen von IFN-γ und TNF-α in NK-Zellen

Um den Anteil der IFN-γ und TNF-α positiven NK-Zellen nach Koinkubation mit HSC zu ermitteln, wurde eine intrazelluläre Färbung von IFN-γ und TNF-α mit Hilfe des „Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit“ von BD durchgeführt. Entscheidend bei diesem Versuch ist die Zugabe von Brefeldin A während der Koinkubation, um die Sekretion der neu synthetisierten Zytokine in das extrazelluläre Milieu zu verhindern. Die Zytokine reichern sich daher in der NK-Zelle an und lassen sich somit nachweisen.

#### Durchführung:

- NK-Zellen auf HSC geben (Verhältnis 1:1)
- 1 h bei 37°C koinkubieren
- 2,5 µl Brefeldin A (10 µg/ml) hinzufügen
- weitere 4 h bei 37°C koinkubieren

- anti-CD56-APC (1:40) und anti-CD3-PerCP (1:150) hinzufügen
- 20 min bei RT schütteln
- NK-Zellen in FACS-Röhrchen überführen und mit 4 ml PBS waschen
- für 10 min bei 300 g zentrifugieren
- Überstand abnehmen und 300 µl Cytofix/Cytoperm hinzufügen
- 20 min bei 4°C inkubieren
- 2 x mit 600 µl Perm/Wasch waschen (dazwischen 10 min bei 400 g zentrifugieren)
- anti-IFN- $\gamma$ -PE (1:30) und anti-TNF- $\alpha$ -FITC (1:30) hinzufügen und 30 min bei 4°C inkubieren
- mit 2 ml Perm/Wash waschen
- für 10 min bei 400 g zentrifugieren
- in 100 µl CellFix aufnehmen und Analyse im Durchflusszytometer

### **3.3.5. Nachweis IL-2 positiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach CD3/CD28 Stimulation**

Der Nachweis von IL-2 positiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte größtenteils wie die in Abschnitt 2.3.5. beschriebene intrazelluläre Färbung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  positiven NK-Zellen. Dabei gab es folgende Änderungen:

- CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit CD3/CD28 gekoppelten Beads stimuliert, keine Koinkubation mit HSC
- Inkubationszeit nach Brefeldin A Zugabe auf 5 h erhöht
- anti-CD4-APC (1:40) hinzugefügt anstatt anti-CD56-APC
- anti-IL-2-PE (1:150) hinzugefügt anstatt anti-IFN- $\gamma$ -PE und anti-TNF- $\alpha$ -FITC

### **3.3.6. Durchflusszytometrie**

In dieser Doktorarbeit wurden die meisten Antikörperfärbungen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Dabei kamen das BD FACSCalibur sowie das BD FACSCanto II zum Einsatz. Das FACSCalibur ermöglicht dabei die gleichzeitige Analyse von vier verschiedenen Fluorophoren, während mit dem FACSCanto II bis zu 8 verschiedene Fluorophore unterschieden werden können.

Generell ist es mit der Durchflusszytometrie möglich, viele Zellen in kurzer Zeit auf Größe, Granularität und markierte Antigene hin zu untersuchen. Dazu werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt und an einem oder mehreren Laserstrahlen

vorbeigeleitet. Trifft der Laserstrahl nun auf eine Zelle, wird dieser je nach Eigenschaft der Zelle unterschiedlich stark gestreut. Dabei wird zwischen dem Vorwärtsstreulicht (*FSC engl. Forward Scatter*) und dem Seitwärtsstreulicht (*SSC engl. Side Scatter*) unterschieden, welche proportional zur Größe (*FSC*) bzw. Granularität (*SSC*) einer Zelle sind. Neben diesen beiden Parametern lassen sich ebenfalls intrazelluläre und membrangebundene Proteine/Antigen im Durchflusszytometer bestimmen. Dazu werden Antikörper verwendet, die mit einem Fluorophor gekoppelt sind, welches durch den Laserstrahl angeregt wird. Das von dem Fluorophor absorbierte Licht wird direkt wieder emittiert und mittels eines speziellen Detektors im Durchflusszytometer gemessen. Je mehr Licht dabei von einer Zelle emittiert wird, desto stärker wird das markierte Protein/Antigen in oder auf der Zelle exprimiert.

### **3.3.7. Immunfluoreszenzfärbungen**

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden Gewebeschnitte aus gefrorenen Leberexplantaten angefertigt. Die Leberexplantate stammen aus Hepatitis C-Virus (HCV) positiven Patienten und wurden im Rahmen einer Organtransplantation entnommen. Zum Anfertigen der Leberschnitte wurden Teile der entnommen Leber in ca. 1 cm kleine Stücke geschnitten und bei -80°C in Isopentan eingefroren. Anschließend wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 8 µm dicke Gewebeschnitte aus den gefrorenen Leberstücken angefertigt, welche für 1 Tag bei RT getrocknet und dann erneut bei -80°C gelagert wurden. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde dann wie folgt durchgeführt:

#### Durchführung:

- Leberschnitte bei RT für 30 min auftauen und trocknen lassen
- mit 4 % PFA für 10 min bei RT fixieren
- 4 x mit 400 µl PBS waschen
- mit 0,25 % Triton X 100 für 10 min bei RT permeabilisieren
- 4 x mit 400 µl PBS waschen
- mit Blockierungspuffer für 1 h bei RT blockieren
- 1. Antikörper in Blockierungspuffer verdünnen (aktive Caspase-3: 1:300; α-SMA: 1:200) und auf Schnitte geben
- über Nacht bei 4°C inkubieren



- 4 x mit 400 µl Blockierungspuffer waschen
- 2. Antikörper in Blockierungspuffer verdünnen (anti-Kaninchen NL-557: 1:400; anti-Maus NL-637: 1:400) und auf Schnitte geben
- 90 min bei RT inkubieren
- 4 x mit 400 µl Blockierungspuffer waschen
- DAPI-Färbung (1:200) für 10 min bei RT
- 4 x mit 400 µl Blockierungspuffer waschen
- eindeckeln mit Aqueous Mounting Medium

### **3.4. Molekularbiologische Methoden**

#### **3.4.1. RNA-Extraktion**

Bei der RNA-Extraktion nutzt man die selektive Bindung von RNA an Silica beschichtete Oberflächen. Daher wird bei diesem Verfahren eine Silica beschichtete Säule verwendet, auf die das komplette Zelllysate gegeben wird. Durch anschließendes Waschen der Säule werden Protein und DNA effektiv entfernt. Zum Abschluss wird die RNA durch Zugabe von destilliertem Wasser von der Säule eluiert.

#### Durchführung:

Für die RNA-Extraktion wurden 200.000 primäre aktivierte humane hepatische Sternzellen verwendet. Zur Lyse der Zellen wurde 350 µl RLT Puffer (im „RNeasy Mini Kit“ enthalten) pro Well auf die Zellen gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Überstand nach mehrmaligem auf und ab pipettieren in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die nachfolgende RNA-Extraktion erfolgte dabei mit dem „RNeasy Mini Kit“ nach Anleitung des Herstellers (Quiagen).

### 3.4.2. Quantifizierung von RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die Absorption der Lösung bei 260 nm mit Hilfe eines Photometers (NanoDrop1000) gemessen, da bei dieser Wellenlänge das Absorptionsmaximum von DNA/RNA liegt. Anhand dieses Wertes lässt sich der RNA-Gehalt in einer Lösung nach folgender Formel ermitteln:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Da Proteine ebenfalls bei dieser Wellenlänge das Licht absorbieren, muss zusätzlich noch die optische Dichte (OD) der Lösung bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) gemessen werden, um Kontaminationen mit Proteinen auszuschließen. Hierbei sollte der Quotient aus  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  zwischen 1,8 und 2 liegen.

### 3.4.3. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird die zuvor extrahierte RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Im Vergleich zu RNA ist cDNA wesentlich stabiler und lässt sich außerdem für eine quantitative Echtzeit-PCR einsetzen.

#### Durchführung:

- Die reverse Transkription erfolgte mit dem „QuantiTect Reverse Transcription Kit“ nach Anleitung des Herstellers (Qiagen).

### 3.4.4. Quantitative Echtzeit-PCR

Die hier eingesetzte quantitative Echtzeit-PCR mit cDNA als Template dient u.a. zur Expressionsanalyse von Genen. Dies beruht auf der Tatsache, dass die hier verwendete cDNA das Expressionsprofil der Zellen zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion widerspiegelt. Mit Hilfe eines Primerpaares, welches im Bereich des Zielgens bindet und einer hitzebeständigen Polymerase, wird das Zielgen vervielfältigt. Dabei erfolgt die Quantifizierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, welcher in die doppelsträngigen DNA-Produkte eingebaut wird. Dies bewirkt eine Zunahme der Fluoreszenzintensität, die mit dem LightCycler detektiert und somit quantifiziert werden kann. Daher lassen sich Rückschlüsse auf die Expression eines Gens schließen, da es bei

einem stark exprimierten Gen zu einer schnelleren Zunahme der Fluoreszenz aufgrund der hohen Anzahl an Templates kommt.

#### Durchführung:

Folgender Reaktionsansatz (bei 4°C):

- 5 µl Maxima SYBR Green pPCR Master Mix (2x)
- 1 µl Primermix (0,5 µM)
- 1 µl Template cDNA
- 3 µl destilliertes Wasser

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung: 10 min 95°C  
50 Zyklen: 95°C für 15 sec, 55°C für 30 sec, 72°C für 30 sec  
Detektion der Fluoreszenz: am Ende des 72°C Schritts

Schmelzkurvenanalyse:

Denaturierung: 95°C für 10 s  
Anlagerung der Sonden: 35°C für 15 s  
Schmelzkurve: 40°C – 80°C (Heizrate 0,2°C/ s) bei kontinuierlicher  
Messung der Fluoreszenz

Sämtliche Primerpaare wurden käuflich bei der Firma Qiagen erworben („QuantiTect-Primer“): Col1A1;  $\alpha$ -SMA; TIMP-1; MMP-2.

### **3.5. Statistische Methoden**

Die statistischen Analysen wurden mit der GraphPad Prism 4.0 Software durchgeführt. Dabei wurden folgende Tests verwendet:

- t-Test für abhängige Stichproben: Vergleich von gepaarten Werten, die normalverteilt sind
- t-Test für unabhängige Stichproben: Vergleich von ungepaarten Werten, die normalverteilt sind

- U-Test von Mann und Whitney: Vergleich von ungepaarten Werten, die nicht normalverteilt sind
- Rangkorrelation nach Spearman: Für Korrelationen mit nicht normalverteilten Werten
- Korrelationskoeffizient nach Pearson: Für Korrelationen mit normalverteilten Werten

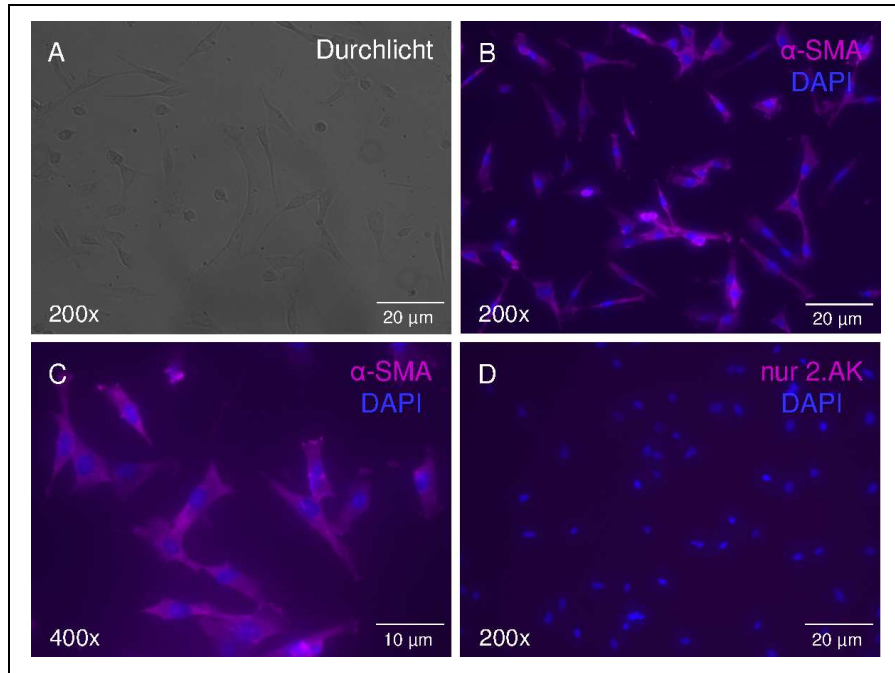
Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen (\*p  $\leq 0.05$ , \*\*p  $\leq 0.01$ , \*\*\*p  $\leq 0.001$ ). Die Daten sind entweder in einem Balkendiagramm (gibt den Mittelwert und den Standardfehler an) oder in einem Dotplot (zeigt die Einzelwerte und den Mittelwert an) dargestellt.

## **4. Ergebnisse**

Die in dieser Doktorarbeit gewonnen Ergebnisse wurden thematisch in vier Abschnitte unterteilt. Dabei wurden in den ersten beiden Teilen der Arbeit die Reinheit und der Aktivierungszustand der käuflich erworbenen primären HSC bestimmt, um fehlerhaften Ergebnissen aufgrund von Kontaminationen mit anderen Zelltypen vorzubeugen (Abschnitt 4.1.) Zusätzlich wurde die NK-Zell-Aktivität gegen LX-2 Zellen und primäre aktivierte hepatische Sternzellen (HSC) ermittelt und miteinander verglichen (Abschnitt 4.2.). Der dritte Abschnitt untersucht dagegen den Einfluss einer Hepatitis C-Virus (HCV)-Infektion auf die Interaktion von NK-Zellen mit primären HSC (Abschnitt 4.3.). Im letzten Teil dieser Dissertation wird zudem die Bedeutung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen im Rahmen einer HIV/HCV-Koinfektion ermittelt (Abschnitt 4.4.).

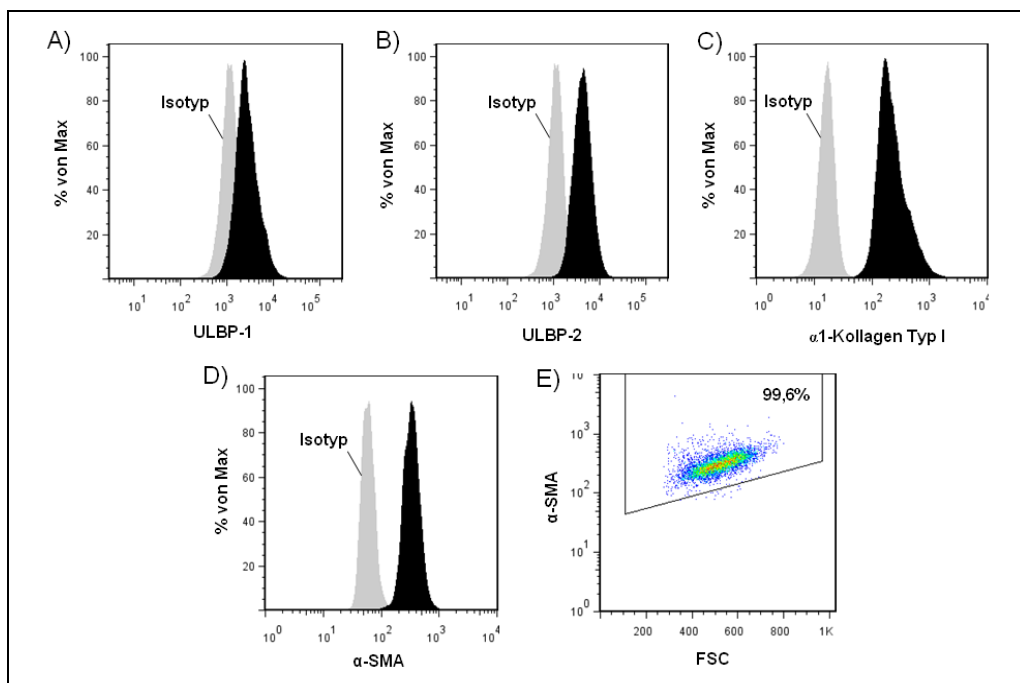
### **4.1. Charakterisierung der primären hepatischen Sternzellen**

Um den Aktivierungszustand und die Reinheit der primären HSC zu verifizieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) durchgeführt. Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, weisen fast alle HSC eine starke Expression von  $\alpha$ -SMA auf, wodurch eine Aktivierung der HSC angezeigt wird. Darüber hinaus erfolgte eine weitere Phänotypisierung der HSC, in dem die Expression von ULBP-1 (UL16 bindendes Protein-1), ULBP-2,  $\alpha$ 1-Kollagen Typ1 und  $\alpha$ -SMA mittels Durchflusszytometer bestimmt wurde (Abbildung 3). Dabei stellte sich heraus, dass über 99 % der HSC positiv für  $\alpha$ -SMA waren und auch die restlichen Marker stark auf den HSC exprimiert wurden.



**Abbildung 2: Nachweis von aktivierten HSC mittels Immunfluoreszenzfärbung von  $\alpha$ -SMA.**

Abbildung A zeigt eine Durchlichtaufnahme von primären HSC. Des Weiteren sind Immunfluoreszenzfärbung gegen  $\alpha$ -SMA (lila) sowie einer Kernfärbung mittels DAPI (blau) in aktivierten HSC dargestellt (B/C). Zuletzt wurde eine Kontrollfärbung des in Abbildung B/C verwendeten 2. Antikörpers durchgeführt (D).  $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -smooth muscle actin



**Abbildung 3: Phänotypische Charakterisierung der HSC mittels Durchflusszytometer.**

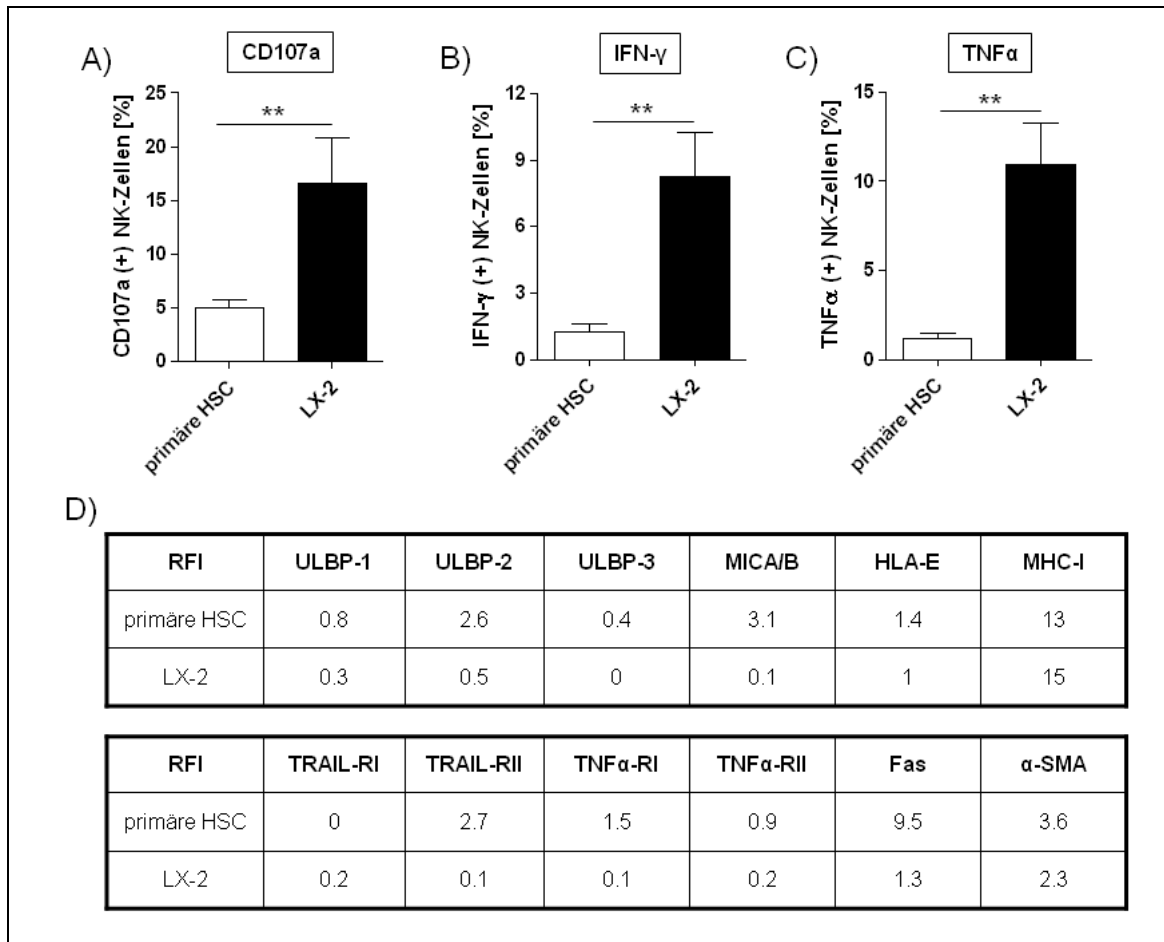
Die HSC wurden mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern auf die Expression von ULBP-1, ULBP-2,  $\alpha$ 1-Kollagen Typ1 und  $\alpha$ -SMA untersucht. Die Ergebnisse sind in Histogrammen dargestellt, welche zusätzlich die jeweilige Isotypfärbung zeigen (A-D). Abbildung E zeigt die  $\alpha$ -SMA Expression in Form eines Dot Plots. Das Gate wurde anhand der Isotyp-Färbung gelegt. ULBP: UL16 bindendes Protein

#### **4.2. Vergleich von LX-2 Zellen mit primären aktivierten hepatischen Sternzellen**

Bei LX-2 Zellen handelt es sich um eine humane hepatische Sternzellenlinie, die durch spontane Immortalisierung unter geringen Serumkonzentrationen aus primären Zellen generiert wurde und einen aktivierten Phänotypen aufweist<sup>135</sup>. Da die LX-2 Zellen bereits in vielen Studien Verwendung fanden, wurden diese einem phänotypischen und funktionellen Vergleich mit primären HSC unterzogen.

Dazu wurden periphere NK-Zellen aus gesunden Probanden mit LX-2 Zellen bzw. primären HSC koinkubiert und anschließend die NK-Zell-Degranulation (CD107a) sowie die IFN- $\gamma$  und TNF $\alpha$  Produktion ermittelt. Die Untersuchungen ergaben, dass NK-Zellen wesentlich zytotoxischer auf LX-2 als auf primäre HSC reagieren. Außerdem induzierte der Kontakt mit LX-2 Zellen die Zytokinproduktion in NK-Zellen, während nach Koinkubation mit primären HSC kaum IFN- $\gamma$  oder TNF $\alpha$  positive NK-Zellen detektiert werden konnten (Abbildung 4A-C).

Ähnlich wie der funktionelle Vergleich deckte die Phänotypisierung einige essentielle Unterschiede zwischen LX-2 und primären HSC auf. So exprimierten primäre HSC die Stressliganden MICA/B, ULBP-1 und ULBP-2 sowie die Todesrezeptoren TRAIL-Rezeptor II, TNF $\alpha$ -Rezeptor I und II sowie Fas, welche nur in sehr geringem Umfang auf LX-2 Zellen zu finden waren. Dagegen wurden das nicht klassische MHC-I Molekül HLA-E, das klassische MHC-I Molekül sowie der Aktivierungsmarker  $\alpha$ -SMA auf beiden Zelltypen exprimiert (Abbildung 4D).



**Abbildung 4: Phänotypischer und funktioneller Vergleich von LX-2 mit primären aktivierten HSC.**

Periphere NK-Zellen (50.000) aus gesunden Spendern wurden mit LX-2 Zellen oder primären aktivierten HSC (E:T-Verhältnis 1:1) kokultiert und anschließend die Frequenz der CD107a (A), IFN- $\gamma$  (B) und TNF $\alpha$  (C) positiven NK-Zellen bestimmt (n=8). Außerdem wurde die Expression wichtiger NK-Zell-Liganden und Todesrezeptoren auf den LX-2 Zellen und den primären HSC mittels Durchflusszytometer gemessen und als RFI (relative Fluoreszenzintensität) dargestellt (D) (Histogramme: siehe Abbildung 11).

Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. \*\*  $p \leq 0,01$ . Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.

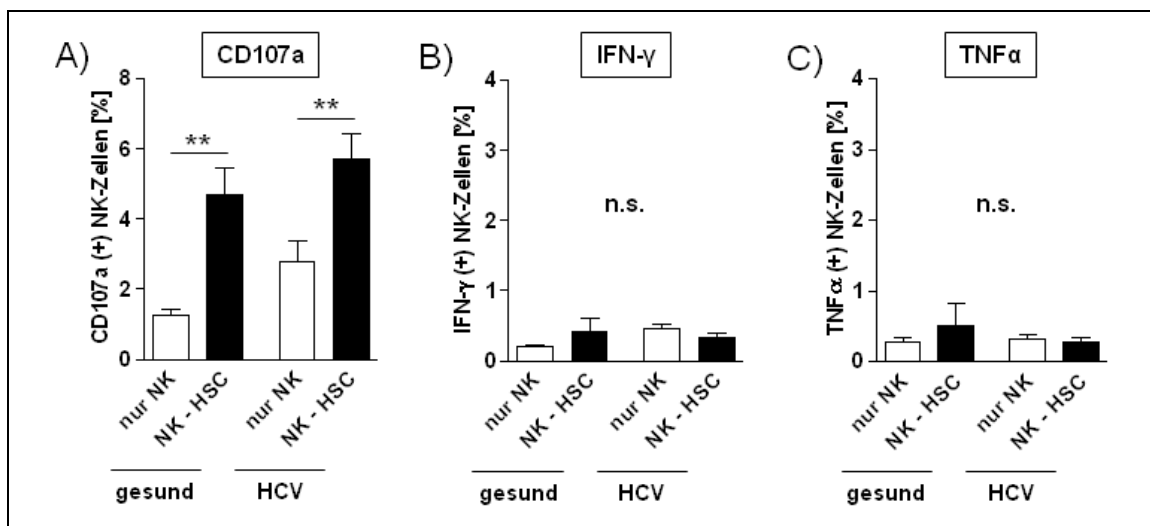


### 4.3. Einfluss einer HCV-Infektion auf die Interaktion von NK-Zellen mit primären aktivierten hepatischen Sternzellen

Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass NK-Zellen anti-fibrotisch wirken können, indem sie in aktivierten HSC Apoptose auslösen. Allerdings ist es zurzeit unklar, ob humane NK-Zellen ebenfalls den Verlauf einer Leberfibrose beeinflussen können und welche Bedeutung dabei eine Hepatitis C-Infektion auf die Interaktion von NK-Zellen und HSC hat.

#### 4.3.1. Koinkubation von peripheren NK-Zellen mit hepatischen Sternzellen

Zu Beginn der Arbeit wurden unstimulierte NK-Zellen aus HCV-infizierten Patienten und gesunden Probanden mit HSC koinkubiert und anschließend die Frequenz der CD107a, IFN- $\gamma$  und TNF $\alpha$  positiven NK-Zellen ermittelt. Dabei zeigte sich, dass NK-Zellen nach Kontakt mit HSC eine signifikant erhöhte CD107a Expression aufweisen, unabhängig davon, ob die NK-Zellen aus gesunden oder HCV-infizierten Spendern stammen (Abbildung 5A). Die CD107a Expression zwischen diesen beiden Spendergruppen unterschied sich dagegen nur minimal. Im Gegensatz dazu wurde keine Zytokinsekretion in Form von IFN- $\gamma$  oder TNF $\alpha$  nach der Koinkubation detektiert (Abbildung 5B+C).



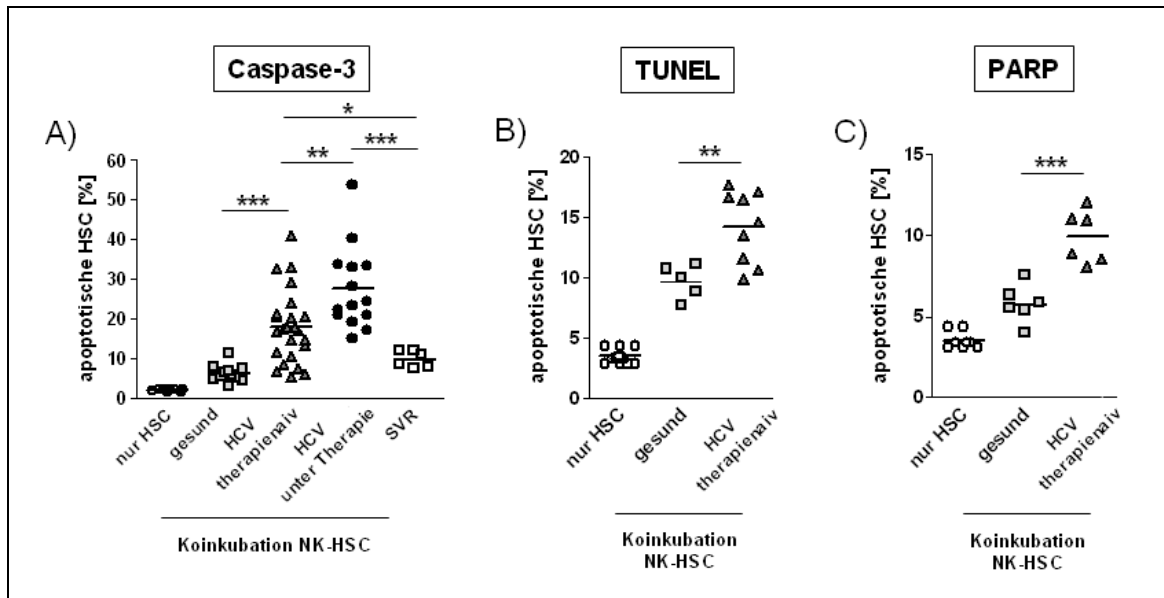
**Abbildung 5: Erhöhte NK-Zell-Degranulation (CD107a) nach Koinkubation mit HSC.**

Periphere NK-Zellen (50.000) aus gesunden oder HCV-infizierten Probanden wurden mit HSC (E:T-Verhältnis 1:1) koinkubiert und anschließend die Frequenz der CD107a (A), IFN- $\gamma$  (B) und TNF $\alpha$  (C) positiven NK-Zellen bestimmt (gesund: n= 9; HCV: n= 6).

Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. \*\*  $p \leq 0,01$ ; n.s. = nicht signifikant. Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.

Neben der HSC induzierten NK-Zell-Aktivität wurde ebenfalls der Anteil der apoptotischen HSC nach Koinkubation mit NK-Zellen mittels intrazellulärer aktiver Caspase-3 Färbung untersucht. Interessanterweise wurde hierbei eine signifikant erhöhte Frequenz an apoptotischen HSC nach Koinkubation mit NK-Zellen aus behandlungsnaiven HCV-infizierten Patienten gefunden, während NK-Zellen aus gesunden Spendern kaum in der Lage waren, Apoptose in HSC zu induzieren. Des Weiteren waren NK-Zellen aus Patienten, die aktuell eine IFN- $\alpha$ /Ribavirin (RBV) Therapie erhielten, sogar noch effektiver, Apoptose in HSC auszulösen. Wurden dagegen NK-Zellen aus Patienten entnommen, die ein dauerhaftes virologisches Ansprechen (SVR, *engl. sustained virological response*) nach einer IFN- $\alpha$ /RBV Therapie zeigten, entsprach der Anteil der apoptotischen HSC nach Koinkubation dem der gesunden Gruppe ([arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler] gesund:  $6,2 \pm 0,6$  %; therapienaiv:  $17,8 \pm 1,9$  %; HCV unter Therapie (IFN- $\alpha$ /RBV):  $27,6 \pm 2,8$  %; SVR:  $9,8 \pm 0,8$  %) (Abbildung 6A).

Um die im Caspase-3 Assays gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen, wurden zusätzlich noch ein TUNEL- (Abbildung 6B) und ein PARP-Assay (Abbildung 6C) durchgeführt, welche ebenfalls eine erhöhte Apoptose-Induktion durch NK-Zellen aus HCV-infizierten Patienten aufdeckten.



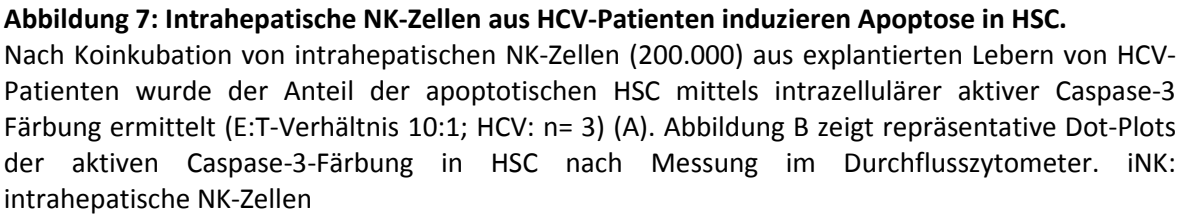
**Abbildung 6: NK-Zellen aus HCV-infizierten Patienten induzieren effektiv Apoptose in aktivierten HSC.**

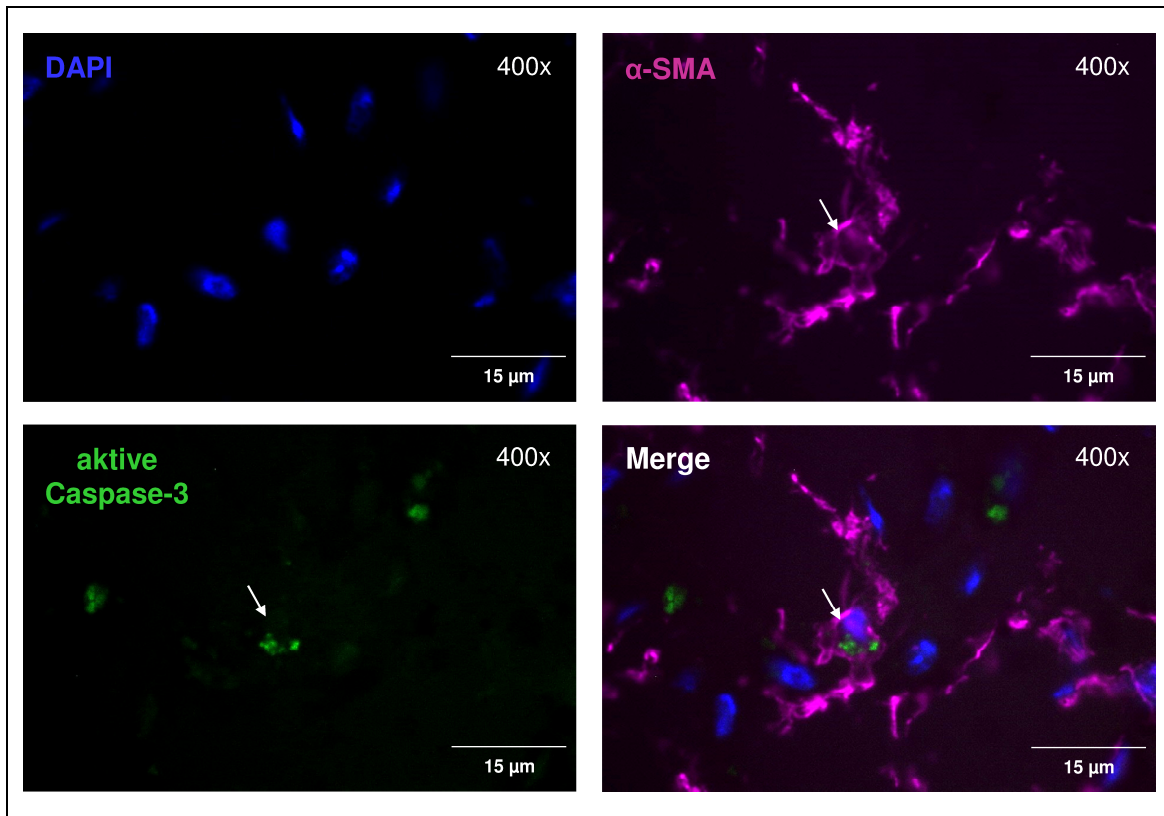
Nach Koinkubation von peripheren NK-Zellen (200.000) aus verschiedenen Patientengruppen mit primären HSC (E:T-Verhältnis 10:1) wurde der Anteil der apoptotischen HSC mittels intrazellulärer aktiver Caspase-3 Färbung ermittelt (gesund: n= 12; HCV therapienaiv: n= 24; HCV unter Therapie (IFN- $\alpha$ /RBV): n= 14; SVR: n=16) (A). Zur Verifizierung der Daten wurde ein TUNEL- (B) bzw. PARP-Assay (C) durchgeführt (TUNEL: gesund: n= 5; therapienaiv: n= 9 / PARP: gesund: n= 6; therapienaiv: n= 6). SVR: dauerhaftes virologisches Ansprechen

Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.3.2. Untersuchung von NK-Zellen aus Lebertransplantaten

Die in Abschnitt 4.3.1. beschriebene Beobachtung, dass NK-Zellen aus HCV-infizierten Patienten in der Lage sind, effektiv Apoptose in HSC zu induzieren, wurde durch die Analyse von NK-Zellen aus dem peripheren Blut gewonnen. Um einen besseren Einblick in die tatsächliche *in vivo* Situation zu erhalten, wurden intrahepatische NK-Zellen aus explantierten, HCV-infizierten Lebern gewonnen und mit HSC koinkubiert. Hierbei zeigte sich, dass intrahepatische NK-Zellen aus HCV-infizierten Patienten ebenfalls im Stande waren, effektiv Apoptose in HSC auszulösen (Abbildung 7).





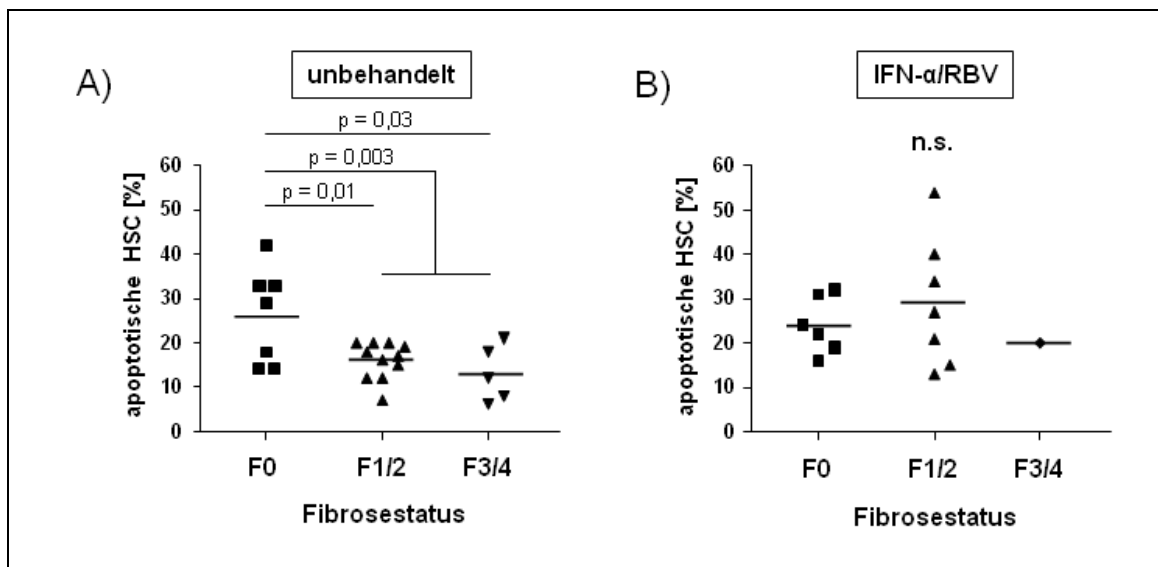
**Abbildung 8: Nachweis von apoptotischen HSC in humanen Leberschnitten mittels Immunfluoreszenzfärbung.**

Exemplarische Darstellung einer Immunfluoreszenzfärbung von  $\alpha$ -SMA (lila), aktiver Caspase-3 (grün) und Zellkernen (blau) in einem Gewebeschnitt aus einer humanen HCV-infizierten Leber. Der Pfeil zeigt dabei eine aktive Caspase-3 und  $\alpha$ -SMA positive Zelle an.

#### 4.3.3. Die *in vitro* NK-Zell-Aktivität gegen HSC korreliert invers mit dem Fibrosestatus

Nachdem gezeigt werden konnte, dass NK-Zellen aus HCV-infizierten Patienten in der Lage sind, effektiv Apoptose in HSC zu induzieren (Abbildung 6A), wurden verschiedene klinische Parameter der Patienten mit der jeweiligen gemessenen NK-Zell-Aktivität korreliert. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen den Leberwerten ALT, AST und  $\gamma$ -GT sowie der NK-Zell-Aktivität beobachtet werden. Auch das Geschlecht, die Viruslast und der HCV-Genotyp hatten keinen Einfluss auf die anti-HSC Aktivität der NK-Zellen. Allerdings stellte sich heraus, dass der Fibrosestatus der Patienten negativ mit der NK-Zell-Aktivität korreliert. Dies bedeutet, dass NK-Zellen aus Patienten, deren Leber starke fibrotische Veränderungen zeigte, deutlich weniger effektiv Apoptose in HSC induzierten als NK-Zellen aus Patienten mit einer leichten oder keiner Leberfibrose (Abbildung 9A). Interessanterweise ergab sich dieser Zusammenhang nur bei HCV-infizierten Patienten,

die keine IFN- $\alpha$ /RBV Therapie erhielten. Im Gegensatz dazu konnte bei der IFN- $\gamma$ /RBV Patientengruppe keine Korrelation mit der NK-Zell-Aktivität gefunden werden (Abbildung 9B).

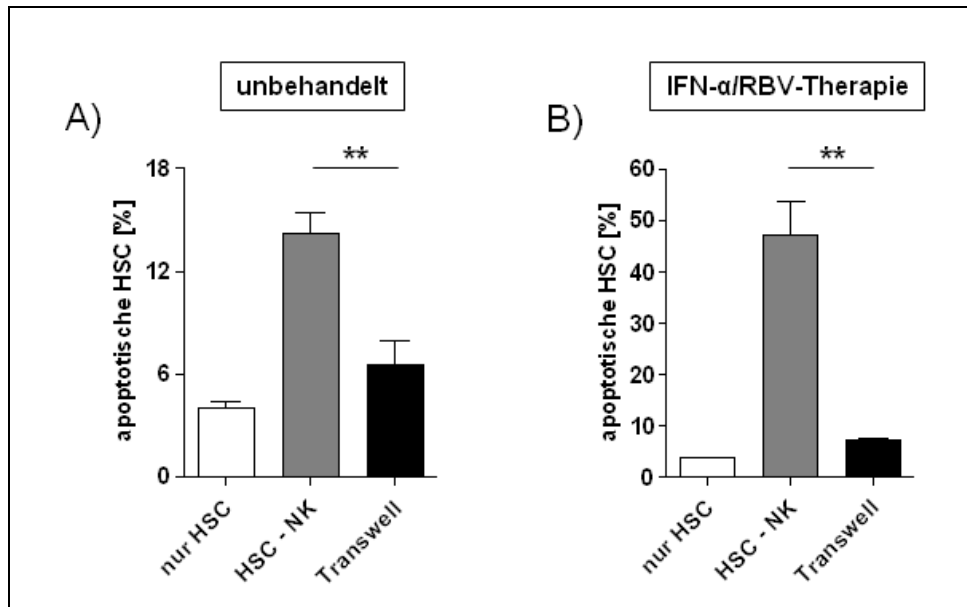


**Abbildung 9: Die *in vitro* NK-Zell-Aktivität gegen HSC korreliert invers mit dem Fibrosestatus.**

Die in Abbildung 6A ermittelte NK-Zell-Aktivität von unbehandelten (A) bzw. IFN- $\alpha$ /RBV behandelten HCV-Patienten (B) wurde gegen den jeweiligen Leberfibrosestatus des Probanden aufgetragen. Dabei erfolgte die Klassifizierung des Fibrosegrades anhand des METAVIR-Scores.

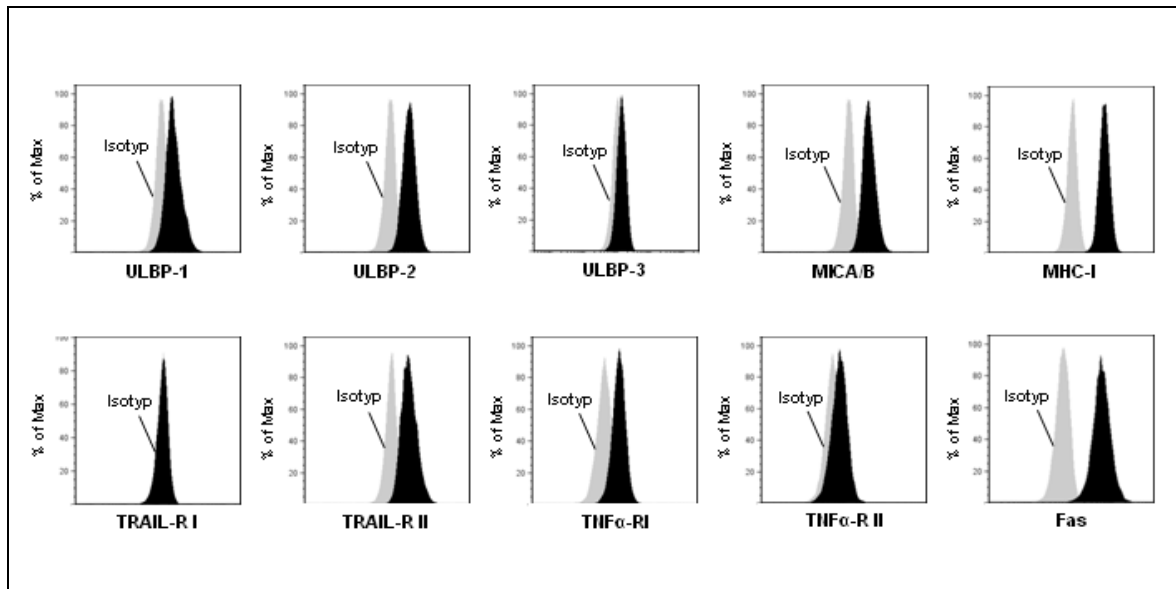
#### 4.3.4. Bei der HSC Apoptose-Induktion durch NK-Zellen spielen NKG2D, TRAIL und FasL eine wichtige Rolle

Im Folgenden sollte geklärt werden, welche Rezeptor/Ligandenpaare bei der Interaktion von NK-Zellen aus HCV-Patienten und HSC von Bedeutung sind. Dazu wurden zunächst Transwell-Experimente durchgeführt, um aufzuklären, ob die Apoptose-Induktion durch lösliche Faktoren oder durch Zell-Zell-Kontakt vermittelt wird. Hierzu wurden NK-Zellen entweder direkt auf die HSC gegeben oder durch eine Transwellmembran räumlich von den HSC getrennt, so dass nur lösliche Faktoren die Membran passieren können. Dabei stellte sich heraus, dass NK-Zellen den direkten Zell-Zell-Kontakt benötigen, um den Apoptoseprozess in HSC auszulösen, da die räumlich getrennten NK-Zellen nicht in der Lage waren, Apoptose in den HSC zu induzieren. Dies galt sowohl für NK-Zellen aus behandlungsnaiven als auch aus IFN- $\alpha$ /RBV behandelten HCV-Patienten (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Die NK-Zell vermittelte Apoptose-Induktion in HSC ist Zell-Zell-Kontakt abhängig.** NK-Zellen (200.000) wurden entweder direkt auf die HSC gegeben oder mit Hilfe einer Transwellmembran (0,4 µm Porendurchmesser) von den HSC räumlich getrennt koinkubiert (E:T-Verhältnis 10:1). Dabei benötigten sowohl NK-Zellen aus behandlungsnaiven (A) als auch aus IFN-α/RBV behandelten HCV-Patienten (B) Zell-Zell-Kontakt, um Apoptose in HSC auszulösen (unbehandelt: n= 4; IFN-α/RBV: n= 3). Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. \*\*  $p \leq 0,01$ . Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.

Als nächstes wurde die Expression von verschiedenen Oberflächenproteinen auf den HSC analysiert, die Apoptosesignale transduzieren bzw. NK-Zellen aktivieren. Wie in der Abbildung 11 gezeigt, konnte eine starke Expression von ULBP-2, MICA/B, MHC-I, TRAIL-Rezeptor II, TNFα-Rezeptor I und Fas nachgewiesen werden. Dagegen waren ULBP-1/3, TRAIL-Rezeptor I und TNFα-Rezeptor II nur sehr schwach oder gar nicht exprimiert.



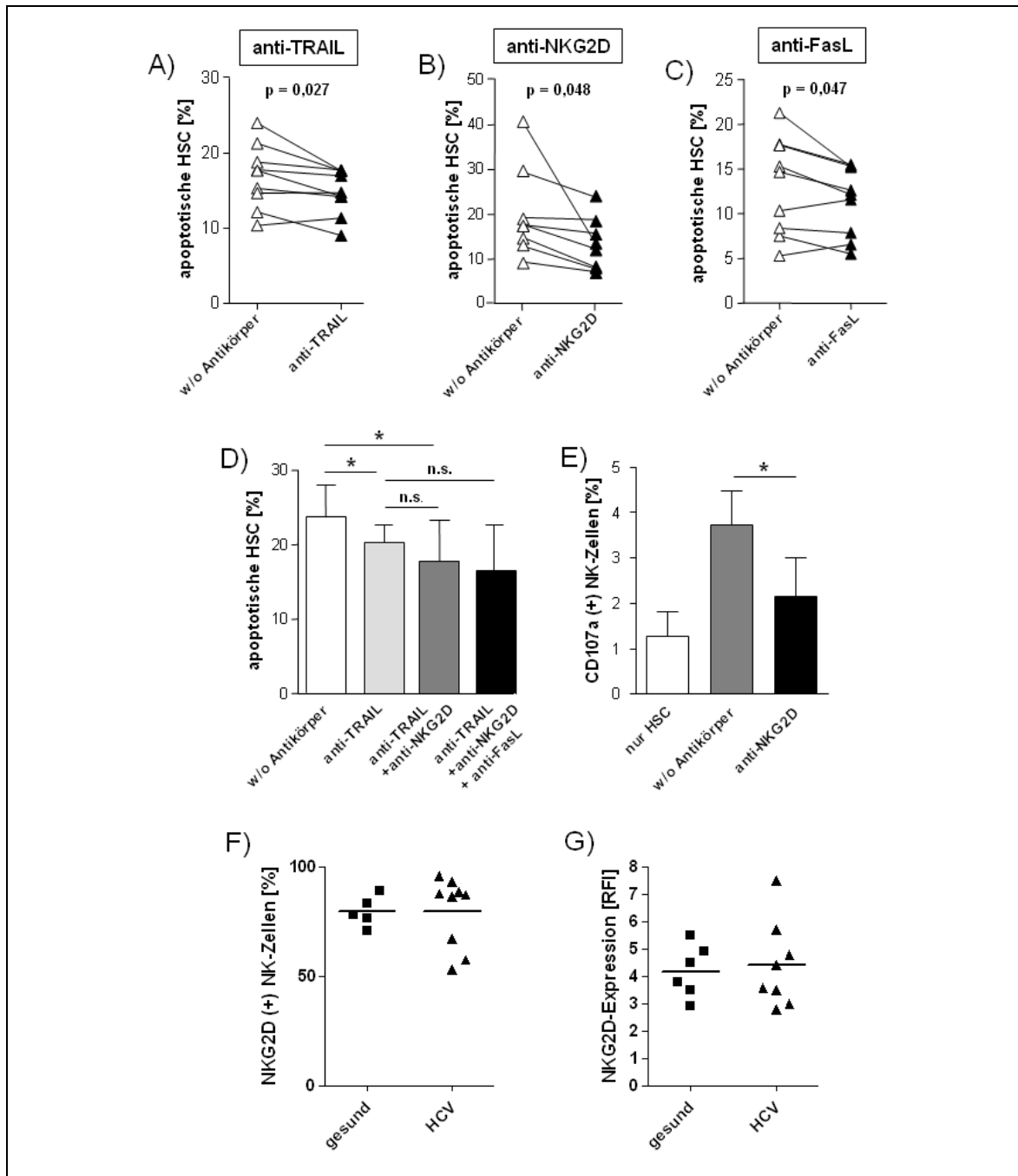
**Abbildung 11: Phänotypische Charakterisierung von HSC mittels Durchflusszytometrie.**

Es wurden verschiedene Oberflächenproteine auf primären aktivierten HSC mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern markiert und im Durchflusszytometer analysiert. Die Ergebnisse sind in Histogrammen dargestellt, welche zusätzlich die jeweilige Isotypfärbung zeigen (RFI-Werte: siehe Abbildung 4D).

Im Anschluss wurden eine Reihe von Blockierungsexperimenten durchgeführt, um die bei der Apoptose-Induktion beteiligten Faktoren näher definieren zu können. Dazu wurden vor und während der Koinkubation neutralisierende Antikörper hinzugegeben. Es stellte sich heraus, dass die blockierenden Antikörper gegen TRAIL, NKG2D und FasL in der Lage waren, die Apoptose-Induktion durch NK-Zellen aus HCV-Patienten signifikant zu hemmen (Abbildung 12A-C). Ebenso konnte ein additiver Effekt beobachtet werden, wenn sowohl TRAIL als auch NKG2D und/oder FasL blockiert wurden (Abbildung 12D). Dagegen ließ sich die NK-Zell-Degranulation (CD107a) bereits effektiv durch Zugabe eines NKG2D Antikörpers blockieren.

Zusätzlich wurde die NKG2D-Expression auf NK-Zellen sowie der Frequenz an NKG2D positiven NK-Zellen bestimmt. Dabei konnte allerdings kein Unterschied zwischen HCV-Patienten und gesunden Probanden gemessen werden (Abbildung 12F/G).





**Abbildung 12: TRAIL, NKG2D und FasL spielen eine wichtige Rolle bei der NK-Zell vermittelten Apoptose-Induktion in HSC.**

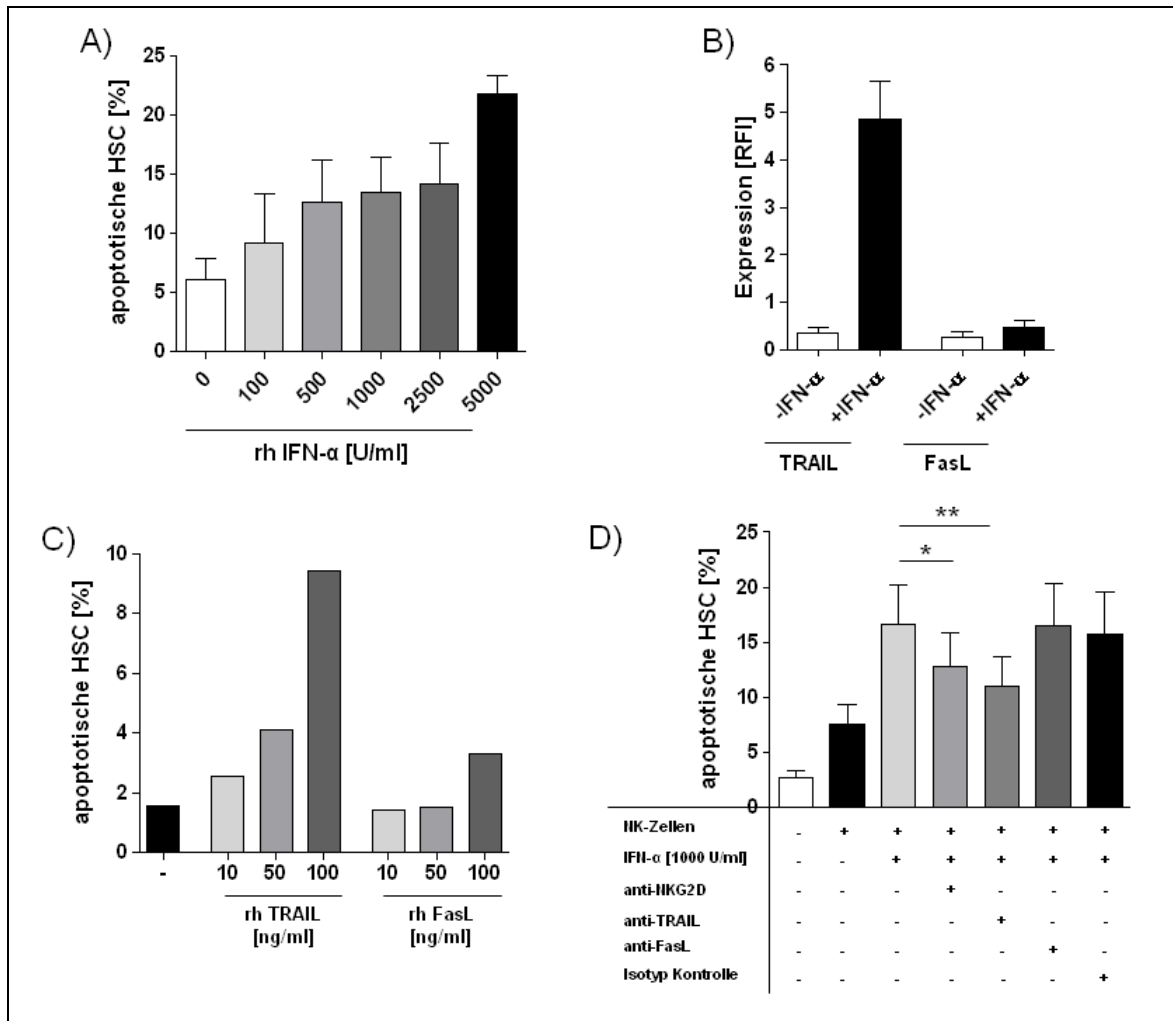
Während der Koinkubation von NK-Zellen (200.000) aus HCV-Patienten und HSC wurde ein blockierender TRAIL- (A), NKG2D- (B) oder FasL- (C) Antikörper (10 µg/ml) hinzugefügt. Danach wurde der Anteil der apoptotischen HSC (aktive Caspase-3 positiv) ermittelt und mit der jeweiligen Apoptose-Induktion durch unblockierte NK-Zellen verglichen (E:T-Verhältnis 10:1). Abbildung D zeigt den Effekt einer kombinierten Blockade von TRAIL, NKG2D und FasL (n= 4) (D). Außerdem wurde der Einfluss von NKG2D auf die NK-Zell-Degranulation (CD107a) bestimmt (n= 4) (E). Darüber hinaus wurde die Frequenz der NKG2D positiven NK-Zellen (F) und die Expression von NKG2D auf NK-Zellen aus gesunden und HCV-Patienten (G) analysiert.

Für die statistische Analyse wurde der gepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. \*  $p \leq 0,05$ . Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.

#### **4.3.5. Die Bedeutung von IFN- $\alpha$ auf die anti-HSC Aktivität von NK-Zellen**

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass IFN- $\alpha$  in der Lage ist, die Aktivität von NK-Zellen zu erhöhen<sup>85,91</sup>. Diese Beobachtung spiegelt sich ebenfalls in den in Abbildung 6 dargestellten Experimenten wieder, wo NK-Zellen aus IFN- $\alpha$  behandelten Patienten die stärkste anti-HSC Aktivität aller untersuchten Patientengruppen aufwiesen. Daher sollte nun überprüft werden, ob IFN- $\alpha$  tatsächlich die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen beeinflusst.

Zu diesem Zweck wurden NK-Zellen aus gesunden Spendern mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinantem IFN- $\alpha$  (0 – 5000 U/ml) behandelt und nach 16 h mit HSC koinkubiert. Wie in Abbildung 13A dargestellt, konnte eine dosisabhängige Aktivierung der NK-Zellen durch IFN- $\alpha$  nachgewiesen werden, da diese deutlich effektiver Apoptose in HSC auslösten. Darüber hinaus wurde eine erhöhte TRAIL-Expression nach IFN- $\alpha$  Behandlung gemessen, während die FasL-Expression nicht beeinflusst wurde (Abbildung 13B). Im Einklang mit diesen Ergebnissen ließ sich der Apoptoseprozess in HSC mit rekombinantem TRAIL induzieren. Die Zugabe von rekombinantem FasL löste dagegen deutlich weniger effektiv Apoptose in HSC aus (Abbildung 13C). Zusätzlich ergaben Blockierungsexperimente, dass sowohl TRAIL als auch NKG2D eine entscheidende Rolle bei der anti-HSC Aktivität durch IFN- $\alpha$  stimulierten NK-Zellen spielen, da die Blockierung dieser beiden Faktoren die Apoptose-Induktion in HSC signifikant reduzierte (Abbildung 13D).



**Abbildung 13: IFN-α stimuliert die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen.**

NK-Zellen (200.000) aus gesunden Probanden wurden über Nacht mit verschiedenen Dosen rekombinanten IFN-α behandelt und anschließend mit HSC koinkubiert (E:T-Verhältnis 10:1). Nach 6h wurde dann die Frequenz der apoptotischen HSC (aktive Caspase-3 positiv) bestimmt (n= 5) (A). Außerdem wurde die TRAIL- und FasL-Expression auf gesunden NK-Zellen nach IFN-α Stimulation [5000 U/ml] gemessen (n= 4) (B). Abbildung C zeigt dagegen den Einfluss von rekombinanten humanem TRAIL oder FasL auf die HSC-Apoptoserate (C). In Abbildung D wurden Blockierungsexperimente durchgeführt, in dem vor und während der Koinkubation mit IFN-α stimulierte NK-Zellen blockierende Antikörper (10 µg/ml) gegen NKG2D, TRAIL und FasL hinzugefügt wurden (n= 5) (D).

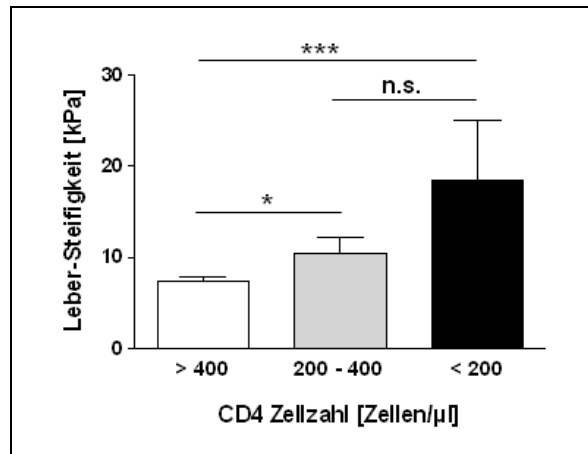
Für die statistische Analyse wurde der gepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ . Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.

#### **4.4. Die Bedeutung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen im Rahmen der HIV/HCV-Koinfektion**

In den letzten Jahren hat eine große Anzahl von Studien eine negative Korrelation zwischen der CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl und dem Grad der Leberfibrose bei einer HIV/HCV-Koinfektion gefunden. Dabei zeigte sich, dass eine niedrige CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl mit einer fortgeschrittenen Leberfibrose einherging, während höhere CD4<sup>+</sup> T-Zellzahlen in der Regel mit niedrigeren Fibrosegraden assoziiert waren. Allerdings ist bisher unklar, durch welche Mechanismen CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Entwicklung einer Leberfibrose beeinflussen können.

##### **4.4.1. Eine geringe CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl geht mit einer fortgeschrittenen Leberfibrose einher**

Zur erneuten Bestätigung dieser Beobachtung wurde eine Querschnittsstudie mit 102 HIV/HCV-Patienten durchgeführt, bei denen die Ergebnisse eines Fibroscan sowie die zu diesem Zeitpunkt ermittelte CD4<sup>+</sup> Zellzahl vorlagen. Die Patienten wurden anhand der CD4<sup>+</sup> Zellzahl in drei Gruppen unterteilt (>400 Zellen/ $\mu$ l; 200-400 Zellen/ $\mu$ l; <200 Zellen/ $\mu$ l), welchen anschließend die jeweilige Leber-Steifigkeit des Patienten zugeordnet wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 zusammengefasst und offenbaren ebenfalls eine signifikante inverse Assoziation zwischen der CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl und der Leber-Steifigkeit.



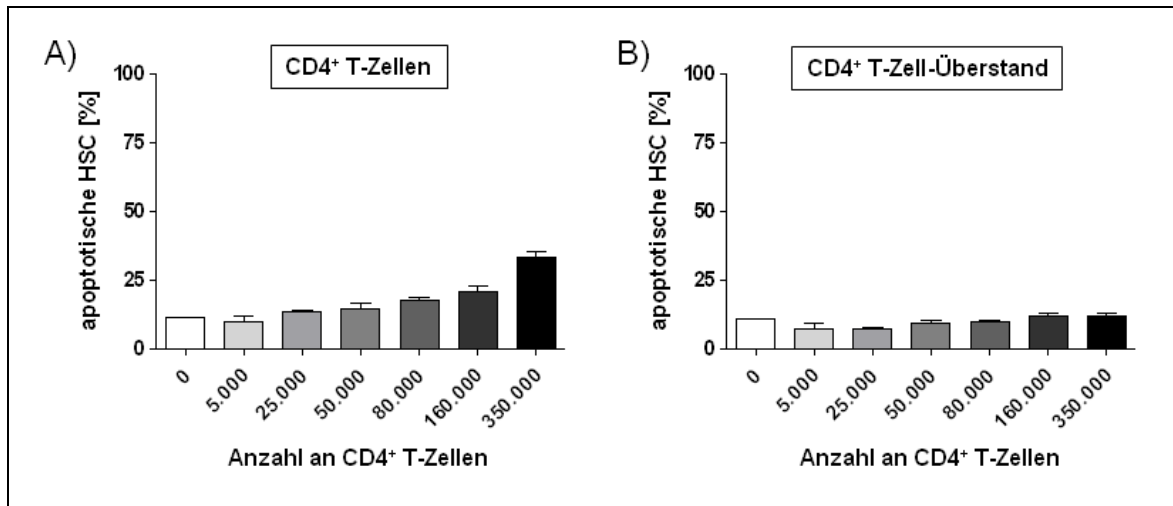
**Abbildung 14: Die CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl korreliert invers mit der Leber-Steifigkeit.**

102 HIV/HCV-Patienten wurden anhand der CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl, die im Rahmen des routinemäßig durchgeführten Differentialblutbildes ermittelt wurden, in drei Gruppen unterteilt (>400 Zellen/μl; 200-400 Zellen/μl; < 200 Zellen/μl). Bei allen Patienten wurde zu dem Zeitpunkt der Blutabnahme ebenfalls die Leber-Steifigkeit mittels Fibroscan bestimmt und mit der CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl korreliert.

Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.

#### 4.4.2. CD4<sup>+</sup> T-Zellen haben eine geringe direkte anti-fibrotische Aktivität

Um die Rolle von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der Fibroseprogression näher zu bestimmen, wurde zuerst die direkte anti-fibrotische Aktivität von CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. Dazu wurde entweder eine zunehmende Anzahl von CD3/CD28 stimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus gesunden Probanden oder der daraus resultierende Überstand mit aktivierten HSC koinkubiert. Die nachfolgende Analyse der aktiven Caspase-3 positiven HSC ergab, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur bei sehr hohen Zellzahlen in der Lage waren, in geringem Umfang Apoptose in HSC zu induzieren (Abbildung 15A). Der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Überstand hatte dagegen überhaupt keinen Einfluss auf die HSC-Apoptoserate (Abbildung 15B). Dies deutet darauf hin, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur eine geringe direkte anti-fibrotische Aktivität haben.



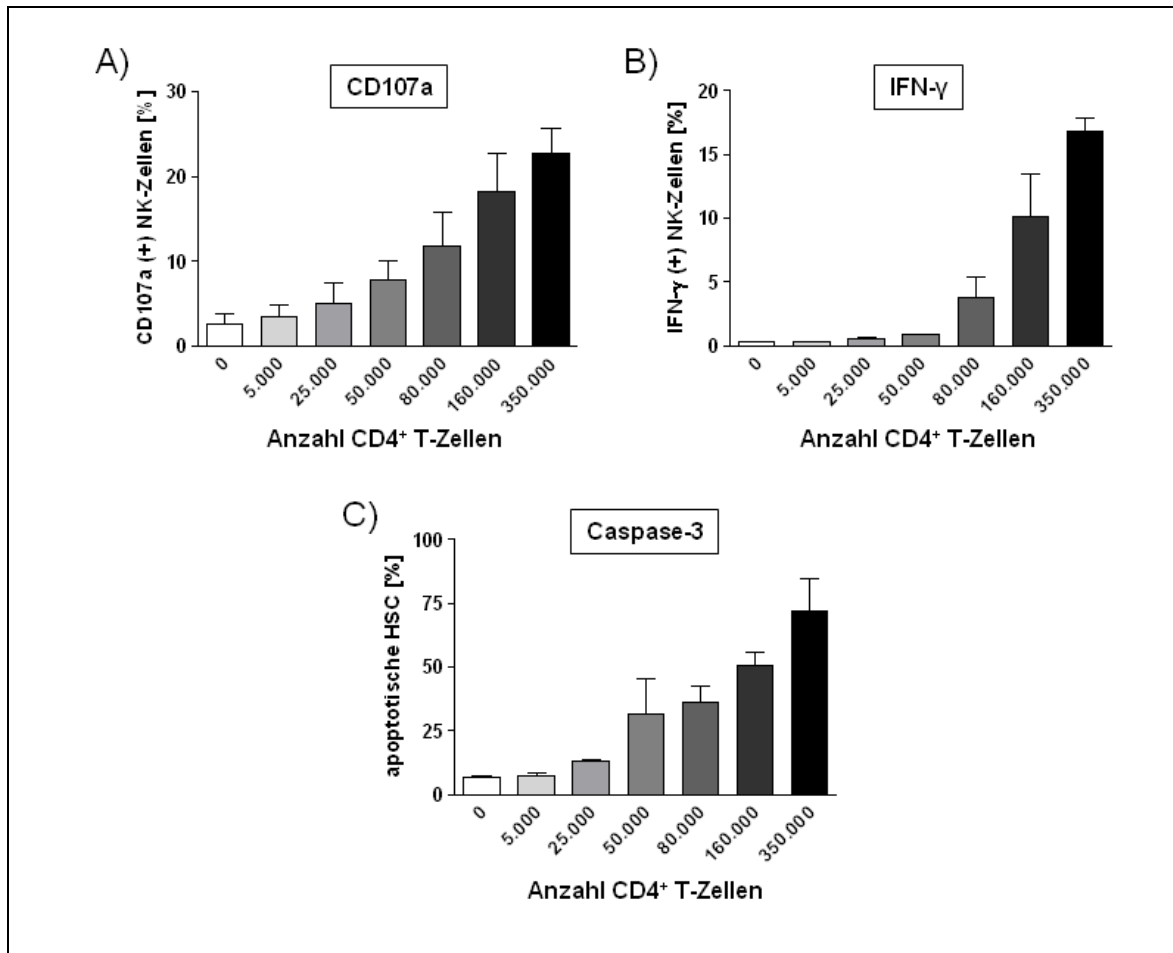
**Abbildung 15: Aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie CD4<sup>+</sup> T-Zell-Überstand lösen kaum Apoptose in aktivierten HSC aus.**

HSC (20.000) wurden mit einer zunehmenden Anzahl von CD3/CD28 aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus gesunden Spendern koinkubiert und anschließend der Anteil der apoptotischen HSC (aktive Caspase-3 positiv) ermittelt (n= 3) (A). Zusätzlich wurde der Überstand der CD3/CD28 aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf HSC gegeben und ebenfalls die HSC-Apoptoserate gemessen (n= 3) (B).

Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.

#### 4.4.3. Der Überstand von CD3/CD28 aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert effektiv die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen

Da keine direkte anti-fibrotische Aktivität durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde nun der Einfluss von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die anti-HSC Aktivität von NK-Zellen analysiert. Wie bereits in Abschnitt 4.3. erläutert, besitzen NK-Zellen durch Apoptose-Induktion in HSC eine direkte anti-fibrotische Aktivität. Zu diesem Zweck wurden NK-Zellen aus gesunden Probanden in dem Überstand von autologen, CD3/CD28 stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen kultiviert und im Anschluss erneut mit HSC koinkubiert. Um die Stärke der NK-Zell-Aktivität zu ermitteln wurde die NK-Zell-Degranulation, IFN- $\gamma$  Sekretion sowie die HSC-Apoptoserate gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die Kultivierung mit CD4<sup>+</sup> T-Zell-Überstand in einer starken NK-Zell-Aktivierung resultierte, die darüber hinaus mit der Anzahl der stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen korrelierte. Dabei stieg der Anteil der CD107a und IFN- $\gamma$  positiven NK-Zellen deutlich an, je mehr CD4<sup>+</sup> T-Zellen verwendet wurden. Diese Beobachtung wurde durch die Analyse der HSC-Apoptoserate bestätigt (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Der Überstand von CD3/CD28 stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert effektiv die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen.**

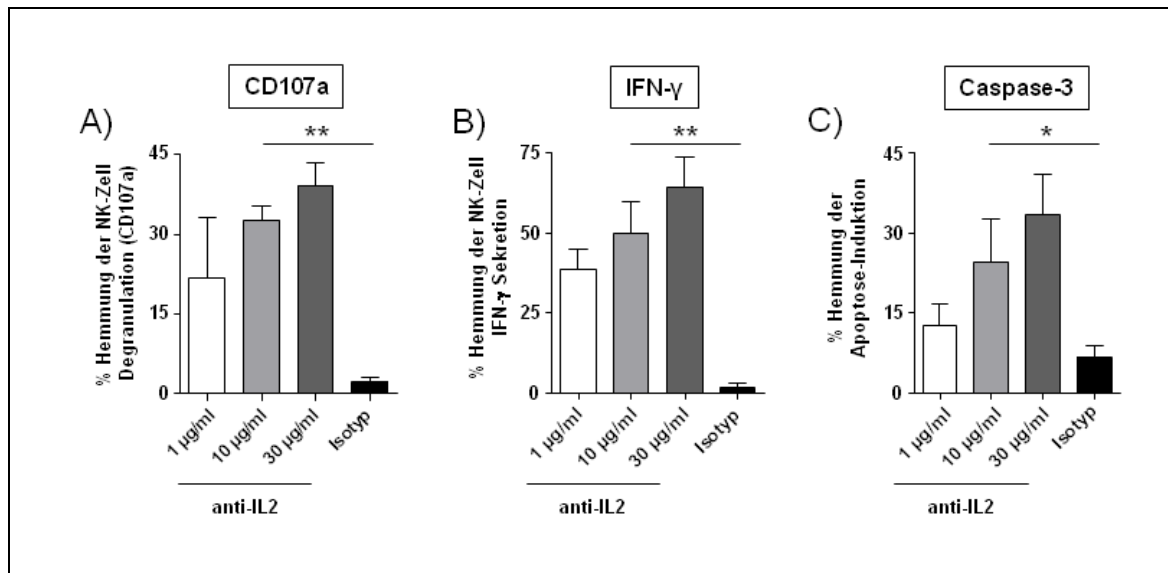
NK-Zellen (100.000) aus gesunden Spendern wurden mit dem Überstand von autologen, CD3/CD28 aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (80.000) stimuliert und im Anschluss mit HSC koinkubiert (E:T-Verhältnis 5:1). Danach wurde die Frequenz der CD107a (A) und IFN-γ (B) positiven NK-Zellen sowie die HSC-Apoptoserate (C) bestimmt (n= 3).

Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.

#### 4.4.4. CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzieren die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen durch IL-2 Sekretion

Nachdem eine indirekte anti-fibrotische Aktivität von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die Aktivierung von NK-Zellen nachgewiesen werden konnte, sollte nun geklärt werden, welche Faktoren hierbei involviert sind. Da bereits der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Überstand ausreicht, um die NK-Zellen zu aktivieren, ließ sich ein Zell-Zell-Kontakt vermittelter Mechanismus ausschließen. Wie allgemein beschrieben, geht eine Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor mit einer starken IL-2 Sekretion einher. IL-2 wiederum ist als starker NK-Zell-Aktivator bekannt. Daher wurde die Rolle von IL-2 durch Blockierungs-

experimente überprüft, indem der  $CD4^+$  T-Zell-Überstand mit verschiedenen Konzentrationen eines blockierenden IL-2 Antikörpers versetzt wurde, bevor die NK-Zellen damit stimuliert wurden. Es zeigte sich, dass die Zugabe des IL-2 Antikörpers dosisabhängig die NK-Zell-Degranulation, IFN- $\gamma$  Sekretion sowie die NK-Zell vermittelte HSC Apoptose-Induktion signifikant reduzieren konnte (Abbildung 17).



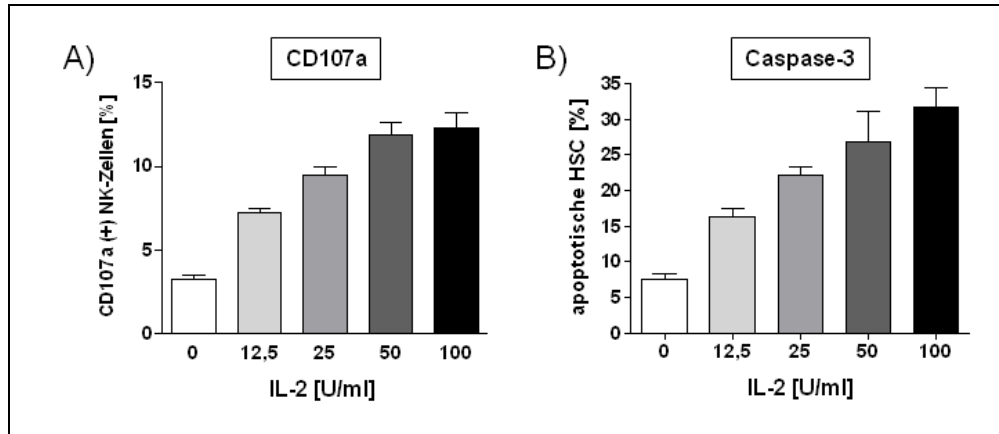
**Abbildung 17: Die Zugabe eines blockierenden IL-2 Antikörpers in den  $CD4^+$  T-Zell-Überstand reduziert die anti-HSC-Aktivität von NK-Zellen.**

Dem Überstand von CD3/CD28 aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen (80.000) wurde vor der NK-Zell-Stimulation verschiedene Konzentrationen eines blockierenden IL-2 Antikörpers hinzugefügt. Nach der Koinkubation mit HSC (20.000) wurde die NK-Zell-Degranulation (A), IFN- $\gamma$ -Sekretion (B) und HSC-Apoptoserate (C) ermittelt und mit der NK-Zell-Aktivität nach Stimulation mit unblockiertem  $CD4^+$  T-Zell-Überstand verglichen (E:T-Verhältnis 5:1; n= 4).

Für die statistische Analyse wurde der gepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ . Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.

Dass IL-2 tatsächlich in der Lage ist, die anti-HSC Aktivität von NK-Zellen zu erhöhen, konnte mit rekombinantem IL-2 nachgewiesen werden. Hier wurde eine dosisabhängige Aktivierung der NK-Zellen gefunden, da die Anzahl der CD107a positiven NK-Zellen sowie der apoptotischen HSC durch IL-2 deutlich erhöht wurde (Abbildung 18).



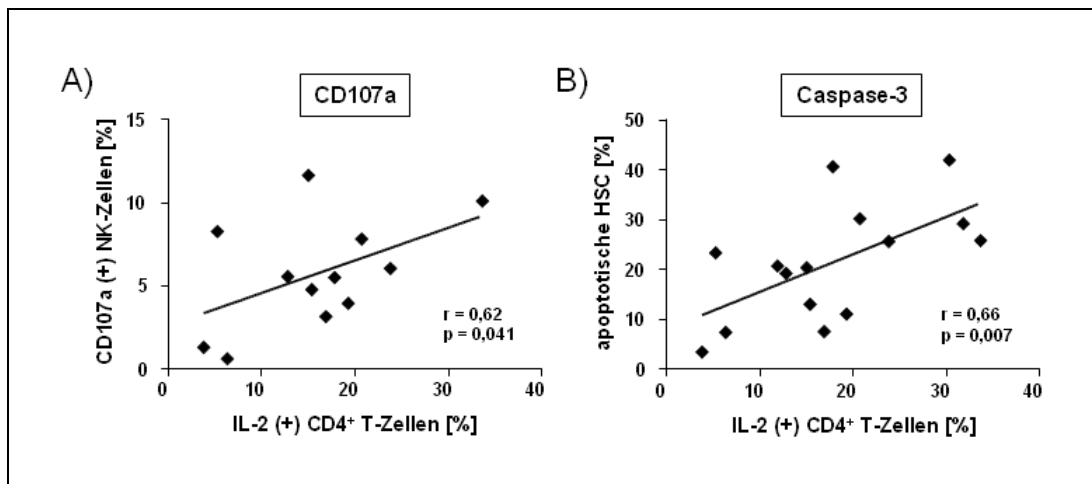


**Abbildung 18: IL-2 induziert die anti-HSC Aktivität von NK-Zellen.**

NK-Zellen (100.000) aus gesunden Probanden wurden vor der Koinkubation mit HSC (E:T-Verhältnis 5:1) mit ansteigenden Konzentrationen an rekombinantem IL-2 stimuliert, was in einer erhöhten NK-Zell-Degranulation (A) und HSC-Apoptoserate (B) resultierte (n= 4).

Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Frequenz der IL-2(+) CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation positiv mit der NK-Zell-Degranulation oder HSC-Apoptoserate korrelierte (Abbildung 19). Zusammen mit den IL-2 Blockierungen sowie der Stimulation mit rekombinantem IL-2 deuten diese Ergebnisse daher auf eine entscheidende Rolle des IL-2 bei der CD4<sup>+</sup> T-Zell vermittelten anti-HSC Aktivität von NK-Zellen hin.

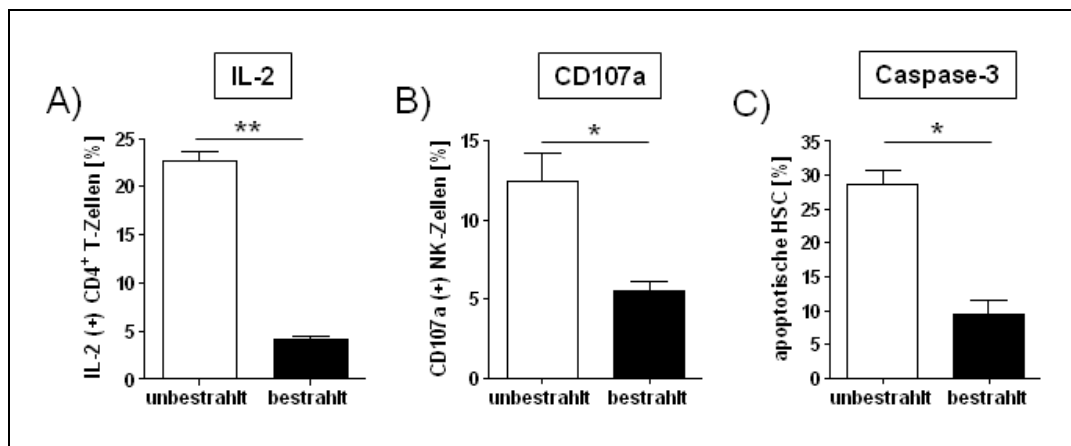


**Abbildung 19: Die Frequenz IL-2 positiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen korreliert mit der anti-fibrotischen Aktivität von NK-Zellen.**

Es wurde die Frequenz der IL-2 positiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Abbildung 24A gegen die Anzahl der CD107a positiven NK-Zellen aufgetragen, die mit dem jeweiligen CD4<sup>+</sup> T-Zell-Überstand stimuliert wurden (n= 12) (A). Zusätzlich wurde der Anteil der apoptotischen HSC mit der Frequenz der IL-2 positiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen korreliert (n= 15) (B).

Für die statistische Analyse wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet.

Zuletzt wurden  $CD4^+$  T-Zellen vor der CD3/CD28 Stimulation mit 34 Gray bestrahlt, wodurch u.a. die Zytokinsynthese infolge der DNA-Schäden beeinträchtigt wird. Nach der Stimulation wurde entweder der intrazelluläre IL-2 Gehalt in den  $CD4^+$  T-Zellen gemessen oder der Überstand zur NK-Zell-Kultivierung verwendet, welche dann mit HSC koinkubiert wurden. Wie erwartet, hatte die Bestrahlung eine gestörte IL-2 Synthese sowie eine verminderte Aktivierung der NK-Zellen zur Folge, da die Anzahl der CD107a positiven NK-Zellen und apoptotischen HSC deutlich verringert war (Abbildung 20).



**Abbildung 20:  $CD4^+$  T-Zellen, die vor der Stimulation bestrahlt wurden, besitzen eine verminderte IL-2-Sekretion und induzieren weniger effektiv die anti-HSC Aktivität von NK-Zellen.**

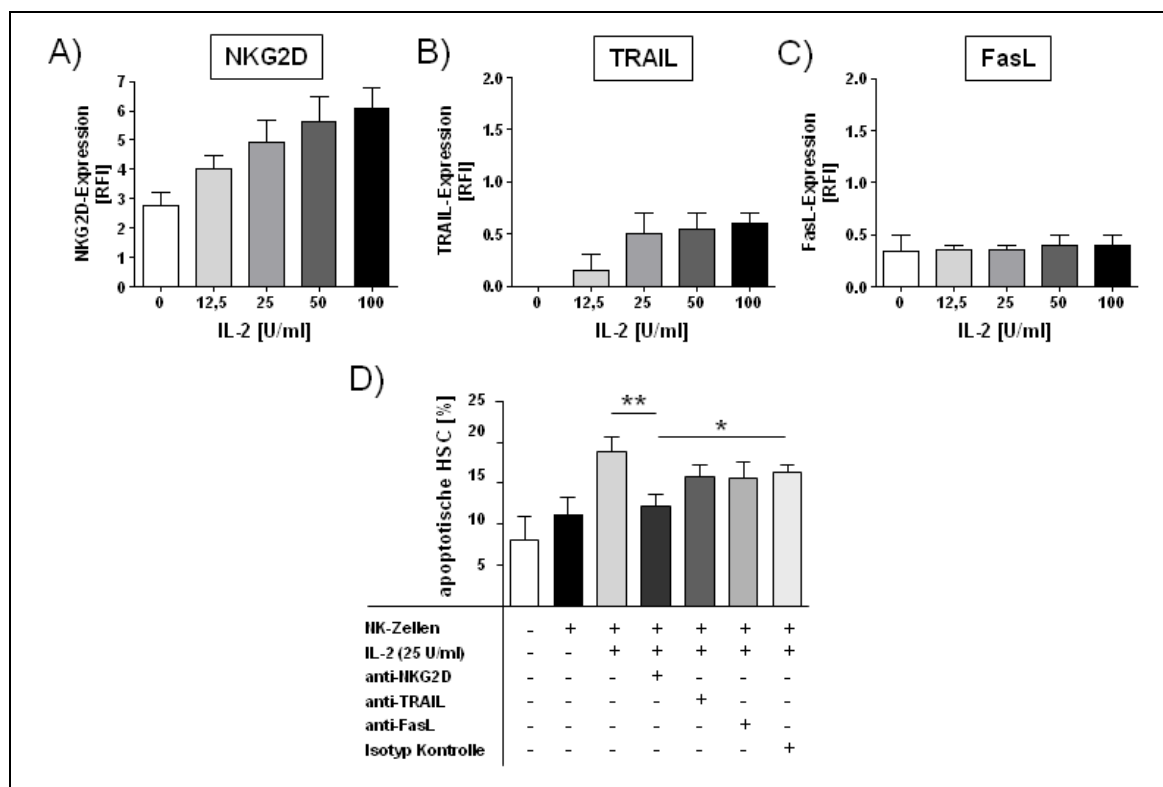
Nach Bestrahlung mit 34 Gray wurden  $CD4^+$  T-Zellen (80.000) mit CD3/CD28 gekoppelten Beads stimuliert. Im Anschluss wurde entweder der Anteil der IL-2 positiven  $CD4^+$  T-Zellen ermittelt (A) oder NK-Zellen (50.000) mit dem resultierenden Überstand stimuliert, welche am nachfolgenden Tag mit HSC koinkubiert wurden (E:T-Verhältnis 5:1; n=3) (B/C).

Für die statistische Analyse wurde der gepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ . Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.

#### 4.4.5. NKG2D spielt eine entscheidende Rolle bei der $CD4^+$ T-Zell induzierten anti-fibrotischen Aktivität von NK-Zellen

Wie im ersten Abschnitt dieser Arbeit bereits dargelegt wurde, spielen NKG2D, TRAIL und FasL eine wichtige Rolle bei der NK-Zell vermittelten Apoptose-Induktion in HSC. Daher wurde nun untersucht, ob die Kultivierung von NK-Zellen mit IL-2 die Expression dieser Proteine beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden NK-Zellen aus gesunden Spendern mit ansteigenden Konzentrationen an rekombinantem IL-2 behandelt und nachfolgend die Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometer bestimmt. Die Messungen

ergaben einen dosisabhängigen Anstieg der NKG2D-Expression auf NK-Zellen, während FasL nicht durch IL-2 beeinflusst wurde. Die Expression von TRAIL war im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen zwar ebenfalls erhöht, allerdings konnte auf unstimulierten NK-Zellen kein TRAIL detektiert werden, so dass die Expression nach IL-2 Behandlung immer noch gering war (Abbildung 21A-C). Um die Bedeutung dieser drei Faktoren zu untermauern, wurden erneut Blockierungsexperimente durchgeführt, in dem neutralisierende Antikörper vor und während der Koinkubation mit IL-2 stimulierten NK-Zellen hinzugefügt wurden. Hierbei konnten die Ergebnisse der Expressionsanalyse bestätigt werden, da nur die NKG2D-Blockade zu einer signifikanten Abnahme der NK-Zell induzierten HSC Apoptose führte, während TRAIL und FasL im Vergleich zur Isotypkontrolle keinen Einfluss hatten (Abbildung 21D).

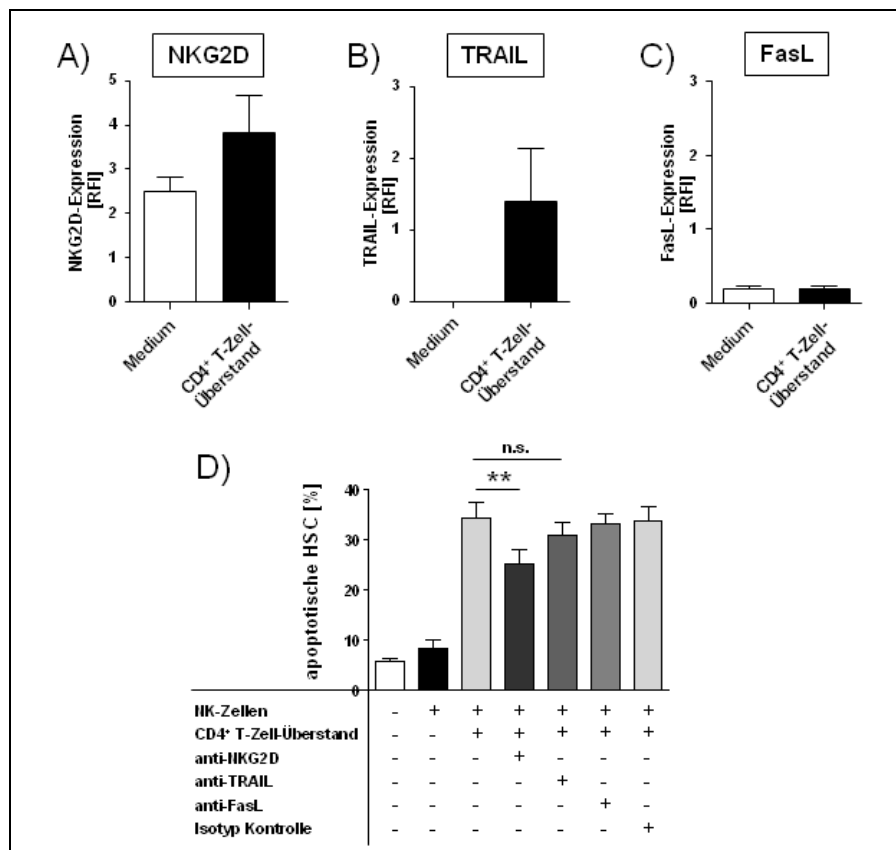


**Abbildung 21: IL-2 führt zu einer erhöhten NKG2D-Expression auf NK-Zellen.**

NK-Zellen aus gesunden Probanden wurden mit verschiedenen IL-2 Konzentrationen kultiviert. Nach 16h wurde die Expression von NKG2D, TRAIL und FasL mittels Durchflusszytometrie analysiert (n= 3) (A-C). Alternativ wurden NKG2D, TRAIL und FasL blockiert (jeweils 10 µg/ml Antikörper), während die stimulierten NK-Zellen (100.000) mit HSC koinkubiert wurden (E:T-Verhältnis 5:1; n= 6) (D).

Für die statistische Analyse wurde der gepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde ein p-Wert von ≤ 0,05 als statistisch signifikant betrachtet. \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01. Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.

Im nächsten Schritt wurde nun der Einfluss des CD4<sup>+</sup> T-Zell-Überstandes auf NK-Zellen analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Kultivierung von NK-Zellen in CD4<sup>+</sup> T-Zell-Überstand ebenfalls zu einer Hochregulation des NKG2D-Rezeptors führte, während die Expression von FasL nicht beeinflusst wurde. Im Gegensatz dazu wurde TRAIL nach Zugabe des CD4<sup>+</sup> T-Zell-Überstandes im Vergleich zu rekombinantem IL-2 etwas stärker exprimiert (Abbildung 22A-C). Dies spiegelte sich auch in den Blockierungsexperimenten wieder, wo die Zugabe eines TRAIL-Antikörpers während der Koinkubation zu einer leichten, allerdings nicht signifikante Reduktion der NK-Zell induzierten HSC-Apoptose führte. Im Unterschied dazu bewirkte der blockierende NKG2D-Antikörper eine signifikante Abnahme der Apoptoserate (Abbildung 22D).

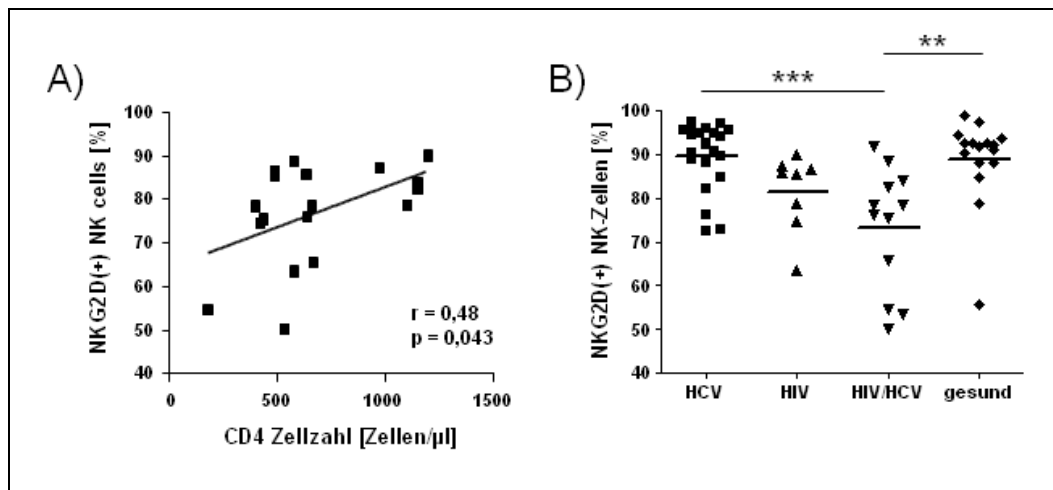


**Abbildung 22: Kultivierung von NK-Zellen in CD4<sup>+</sup> T-Zell-Überstand führt zu einer erhöhten NKG2D-Expression.**

NK-Zellen aus gesunden Spendern wurden mit dem Überstand von CD3/CD28 aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (80.000) kultiviert. Nach 16h wurde die Expression von NKG2D, TRAIL und FasL mit Hilfe des Durchflusszytometers ermittelt (n= 3) (A-C). Alternativ wurden NKG2D, TRAIL und FasL blockiert (jeweils 10 µg/ml Antikörper), während die NK-Zellen (100.000) mit HSC koinkubiert wurden (E:T-Verhältnis 5:1; n= 4) (D).

Für die statistische Analyse wurde der gepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde ein p-Wert von ≤ 0,05 als statistisch signifikant betrachtet. \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01. Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.

Da dem aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2D eine entscheidende Bedeutung bei der  $CD4^+$  T-Zell vermittelten Aktivierung von NK-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde nun nach Hinweisen gesucht, welche die *in vivo* Relevanz dieser Beobachtung unterstreichen. Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der NKG2D(+) NK-Zellen und der  $CD4^+$  T-Zellzahl in HIV- und HIV/HCV-Patienten gefunden werden (Abbildung 23A). Zusätzlich war die Frequenz der NKG2D(+) NK-Zellen bei Patienten mit einer HIV-Mono- bzw. HIV/HCV-Koinfektion im Vergleich zu HCV-monoinfizierten bzw. gesunden Probanden signifikant verringert (Abbildung 23B).



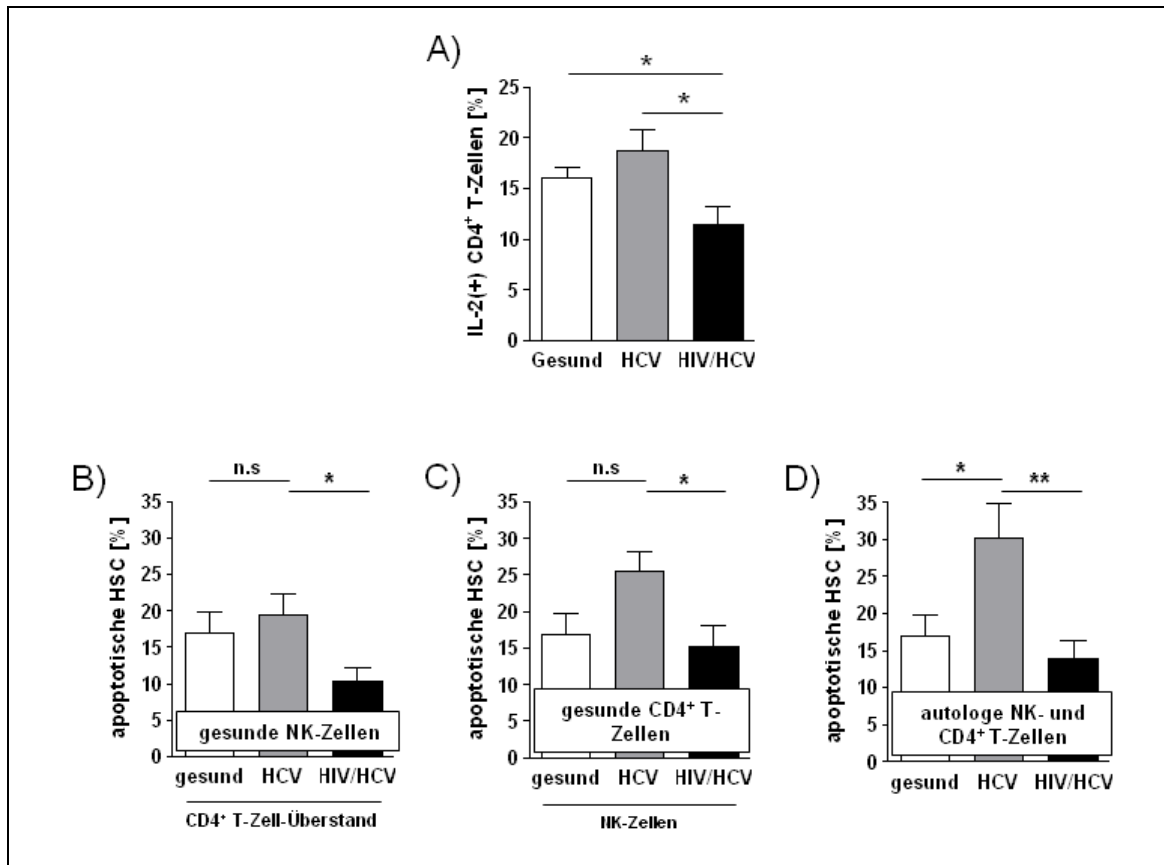
**Abbildung 23: Die  $CD4^+$  T-Zellzahl korreliert positiv mit der Frequenz der NKG2D(+) NK-Zellen.**

Es wurde die  $CD4^+$  T-Zellzahl, die im Rahmen des routinemäßig durchgeführten Differentialblutbildes ermittelt wurden, gegen den Anteil der NKG2D(+) NK-Zellen des jeweiligen HIV- bzw. HIV/HCV-Patienten aufgetragen ( $n = 18$ ) (A). Außerdem wurde die prozentuale Häufigkeit der NKG2D positiven NK-Zellen bei HCV-, HIV-, HIV/HCV-Patienten sowie gesunden Probanden gemessen (B) (gesund:  $n = 16$ ; HCV:  $n = 21$ ; HIV/HCV:  $n = 12$ ; HIV:  $n = 8$ ).

Für die statistische Analyse wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson bzw. der ungepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.

#### **4.4.6. CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus HIV/HCV-koinfizierten Patienten induzieren weniger effektiv die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen**

Zum Abschluss der Arbeit wurde die Frequenz der IL-2 positiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach CD3/CD28 Stimulation ermittelt, um mögliche Unterschiede zwischen HCV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten sowie gesunden Spendern aufzudecken. Dazu wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) für 6h mit CD3/CD28 gekoppelten Beads stimuliert. Anschließend wurde der Anteil der IL-2 positiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels intrazellulärer IL-2 Färbung und Analyse im Durchflusszytometer ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Frequenz der IL-2 positiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu HCV-monoinfizierten und gesunden Probanden bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten signifikant verringert war (Abbildung 24A). Im Einklang mit dieser Beobachtung induzierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus HIV/HCV-koinfizierten Patienten weniger effektiv die anti-fibrotische Aktivität von gesunden NK-Zellen als CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus HCV-infizierten oder gesunden Spendern (Abbildung 24B). Darüber hinaus besaßen NK-Zellen aus HIV/HCV-koinfizierten Patienten im Vergleich zu NK-Zellen aus HCV-monoinfizierten Patienten eine signifikant geringere anti-HSC-Aktivität, wenn diese mit CD4<sup>+</sup> T-Zell-Überstand aus gesunden Probanden stimuliert wurden (Abbildung 24C). Interessanterweise war der Unterschied bei der CD4<sup>+</sup> T-Zell induzierten NK-Zell-Aktivierung noch ausgeprägter, wenn die NK- und CD4<sup>+</sup> T-Zellen von der gleichen Person stammten (Abbildung 24D).

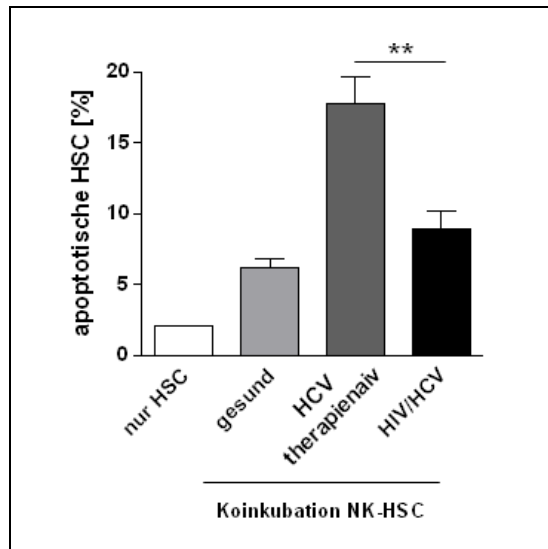


**Abbildung 24: CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus HIV/HCV-Patienten weisen eine verminderte IL-2 Sekretion auf.**

Nach Stimulation von PBMC (200.000) aus verschiedenen Patientengruppen mit CD3/CD28 gekoppelten Beads wurde die Frequenz der IL-2 positiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen ermittelt (A) (gesund: n= 13; HCV: n= 12; HIV/HCV: n= 9). Zusätzlich wurden mit dem CD4<sup>+</sup> T-Zell-Überstand NK-Zellen (100.000) stimuliert, welche anschließend mit HSC koinkubiert wurden (E:T-Verhältnis 5:1). Dabei wurden entweder gesunde NK-Zellen mit dem Überstand von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (80.000) aus den verschiedenen Patientengruppen stimuliert (B) oder es wurde der Überstand von gesunden CD4<sup>+</sup> T-Zellen verwendet, um die NK-Zellen aus verschiedenen Patientengruppen zu aktivieren (C). In der letzten Abbildung stammen dagegen sowohl NK-Zellen als auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus dem gleichen Spender (D) (gesund: n= 10; HCV: n= 7; HIV/HCV: n= 10).

Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; n.s. = nicht signifikant. Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.

Zuletzt sollte überprüft werden, ob auch unstimulierte NK-Zellen aus HIV/HCV-koinfizierten Patienten eine gestörte anti-fibrotischen Aktivität besitzen. Dazu wurden periphere NK-Zellen aus verschiedenen Patientengruppen mit aktivierten HSC koinkubiert. Die Messung der apoptotischen HSC ergab, dass NK-Zellen aus HIV/HCV-koinfizierten Patienten eine deutlich geringere anti-fibrotische Aktivität besitzen, als NK-Zellen aus HCV-monoinfizierten Probanden.



**Abbildung 25: NK-Zellen aus HIV/HCV-koinfizierten Patienten induzieren weniger effektiv Apoptose in aktivierten HSC als NK-Zellen aus HCV-monoinfizierten Probanden.**

Nach Koinkubation von unstimulierten peripheren NK-Zellen (200.000) aus verschiedenen Patientengruppen mit HSC wurde der Anteil der apoptotischen HSC mittels intrazellulärer aktiver Caspase-3 Färbung ermittelt (E:T-Verhältnis 10:1; gesund: n= 12; HCV therapienaiv: n= 24; HIV/HCV n= 14).

Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. \*\*  $p \leq 0,01$ . Die Säulen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler des Mittelwertes an.



## 5. Diskussion

### 5.1. Charakterisierung der primären aktivierten hepatischen Sternzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten primären hepatischen Sternzellen (HSC) wurden käuflich von der Firma ScienCell erworben und waren bereits in einer ganzen Reihe vorheriger Veröffentlichungen verwendet worden<sup>93,105,132–134</sup>. Dennoch wurden die HSC zu Beginn charakterisiert, um die Reinheit und den aktivierten Zustand der Zellen zu bestätigen. Als Hauptmarker für aktivierte HSC gilt  $\alpha$ -SMA (*engl.  $\alpha$ -smooth muscle actin*)<sup>138,139</sup>, dessen Expression in 99 % aller HSC nachgewiesen werden konnte. Zudem zeigten fast alle HSC eine starke Expression von  $\alpha$ 1-Kollagen Typ I, ULBP-1 und 2, welche ebenfalls als Marker für aktivierte HSC beschrieben wurden<sup>101,140</sup>. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die HSC einen aktivierten Phänotyp besitzen und keine Kontaminationen mit anderen Zelltypen vorliegen.

### 5.2. Vergleich von LX-2 Zellen mit primären aktivierten hepatischen Sternzellen

Im Mausmodell konnte bereits vor einigen Jahren gezeigt werden, dass NK-Zellen durch Apoptose-Induktion in aktivierten HSC anti-fibrotisch wirken können<sup>98–104</sup>. Dagegen ist die Bedeutung von humanen NK-Zellen bei der Leberfibroseprogression größtenteils unklar, da bisherige Studien lediglich die Interaktion von NK-Zellen mit der humanen Sternzelllinie LX-2 analysierten<sup>100,104</sup>, die durch spontane Immortalisierung unter geringen Serumkonzentrationen generiert wurden. Zwar besitzen LX-2 Zellen eine sehr ähnliche Genexpression wie primäre aktivierte HSC (98,7 %)<sup>135</sup>, allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass NK-Zellen sehr viel stärker auf den Kontakt mit LX-2 als auf primäre HSC reagieren. Zudem ergab der phänotypische Vergleich einiger wichtiger NK-Zell-Liganden, dass LX-2 Zellen im Gegensatz zu den primären HSC kein ULBP-1 und 2, sowie MICA/B exprimieren. Dies ist zwar keine Erklärung für die erhöhte NK-Zell-Zytotoxizität, da es sich hierbei um Liganden für den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2D handelt<sup>141</sup>, deutet jedoch entscheidende Unterschiede dieser beiden Zellarten an. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit nur noch primäre aktivierte HSC verwendet, um der *in vivo* Situation möglichst nahe zu kommen.

### **5.3. Einfluss einer HCV-Infektion auf die Interaktion von NK-Zellen mit primären aktivierten hepatischen Sternzellen**

Im Rahmen dieses Projektes sollte die Frage geklärt werden, ob humane NK-Zellen ebenfalls in der Lage sind, Apoptose in aktivierten HSC zu induzieren und somit anti-fibrotisch zu wirken. Zusätzlich sollte der Einfluss einer HCV-Infektion auf die anti-fibrotische Aktivität ermittelt werden.

Dabei zeigte sich, dass NK-Zellen nach Kontakt mit HSC eine signifikant erhöhte CD107a Expression aufwiesen, unabhängig davon, ob die NK-Zellen aus gesunden oder HCV-infizierten Probanden stammen. Der Kontakt mit HSC führt somit zu einer Aktivierung der NK-Zellen, wobei eine HCV-Infektion wenig Einfluss auf die Stärke der Aktivierung hat. Allerdings induzierten NK-Zellen aus behandlungsnaiven HCV-Patienten wesentlich effektiver Apoptose in HSC als NK-Zellen aus gesunden Spendern oder aus ehemaligen HCV-Patienten, die eine erfolgreiche HCV-Therapie hinter sich hatten. Dies deutet auf einen HCV-spezifischen Effekt hin, der durch die Abwesenheit des Virus aufgehoben wird.

Da der direkte Kontakt mit HCV-Virionen keine Auswirkungen auf die NK-Zell-Aktivität hat<sup>142</sup>, scheinen die NK-Zellen durch einen indirekten Mechanismus beeinflusst zu werden. In diesem Zusammenhang konnte Ahlenstiel et al. kürzlich zeigen, dass eine HCV-Infektion zu einem polarisierten, zytotoxischen NK-Zell-Phänotyp aufgrund der chronischen Exposition mit IFN- $\alpha$  führt<sup>91</sup>. Das IFN- $\alpha$  stammt hierbei wahrscheinlich aus HCV-infizierten Hepatozyten und dendritischen Zellen und bewirkt eine erhöhte TRAIL-Expression auf NK-Zellen<sup>85</sup>. Interessanterweise konnte die Bedeutung von IFN- $\alpha$  bei der anti-fibrotischen NK-Zell-Aktivität auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden, da NK-Zellen aus HCV-Patienten, die aktuell eine Therapie mit pegyliertem IFN- $\alpha$  erhielten, am effektivsten Apoptose in HSC induzierten. Darüber hinaus führte die Stimulation von gesunden NK-Zellen mit rekombinantem IFN- $\alpha$  zu einer gesteigerten anti-fibrotischen Aktivität. Dies könnte eine Erklärung sein, warum die Behandlung mit IFN- $\alpha$  im Rahmen einer HCV-Therapie zu einer deutlichen Verbesserung der Leberfibrose führt<sup>143–145</sup>, selbst wenn die Patienten weiterhin virämisch bleiben<sup>146,147</sup>.

Zusätzlich konnte der Einfluss des Todesliganden TRAIL bei der anti-HSC-Aktivität durch NK-Zellen verifiziert werden. So exprimieren aktivierte HSC den für die Apoptose-

Induktion notwendigen TRAIL-Rezeptor II, der durch Zugabe von rekombinantem TRAIL aktiviert wurde und den Apoptoseprozess in HSC auslöste. Zudem führte die Stimulation mit rekombinantem IFN- $\alpha$  auf gesunden NK-Zellen zu einer Hochregulation der TRAIL-Expression. Im Einklang mit dieser Beobachtung konnte durch Zugabe eines blockierenden TRAIL-Antikörpers die Apoptose-Induktion in HSC durch IFN- $\alpha$ -stimulierte NK-Zellen signifikant gehemmt werden. Allerdings war dieser Effekt bei den *in vitro* stimulierten NK-Zellen wesentlich deutlicher, als bei den NK-Zellen aus HCV-Patienten, so dass hier weitere Faktoren eine Rolle spielen müssen. Dennoch scheint IFN- $\alpha$  eine starke anti-fibrotische Wirkung zu besitzen, die durch eine erhöhte TRAIL-Expression auf NK-Zellen vermittelt wird.

Der Einfluss einer HCV-Infektion auf die TRAIL-Expression wird dagegen kontrovers diskutiert. So wurde zum einen eine gesteigerte TRAIL-Expression sowie eine erhöhte Frequenz an TRAIL positiven peripheren NK-Zellen bei HCV-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden, wobei die korrespondierenden intrahepatischen NK-Zellen TRAIL noch stärker exprimierten<sup>91</sup>. Andererseits fand eine aktuelle Studie eine reduzierte intrahepatische Frequenz an TRAIL positiven NK-Zellen bei einer HCV-Infektion<sup>95</sup>, so dass weiterhin unklar ist, wie TRAIL durch eine HCV-Infektion beeinflusst wird. Allerdings stimmen alle Studien darin überein, dass die Behandlung mit IFN- $\alpha$  die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen infolge der erhöhten TRAIL-Expression verstärkt<sup>85,91,95</sup>, wodurch die hier gemachte Beobachtung, dass NK-Zellen aus IFN- $\alpha$  behandelten Patienten die stärkste anti-fibrotische Aktivität aufwiesen, untermauert wird.

Eine Beteiligung von Ribavirin, welches neben IFN- $\alpha$  zur Standardtherapie einer HCV-Infektion zählt, bei der Induktion der anti-fibrotischen NK-Zell-Aktivität ist eher unwahrscheinlich, da Ribavirin keinen Einfluss auf die TRAIL-Expression hat<sup>85</sup>. Dennoch könnte Ribavirin die anti-fibrotische Aktivität über einen anderen Mechanismus beeinflussen, der hier aber nicht weiter untersucht wurde.

Aufgrund der Blockierungsexperimente mit einem TRAIL-Antikörper, die eine signifikante, aber nicht vollständige Hemmung der NK-Zell induzierten HSC-Apoptose ergaben, wurde die Bedeutung von weiteren Faktoren analysiert. Da eine starke Expression von Fas auf aktivierten HSC nachgewiesen werden konnte, wurde FasL auf NK-

Zellen aus HCV-Patienten während der Koinkubation mit HSC blockiert. Dabei zeigte sich, dass FasL ebenfalls bei der Apoptose-Induktion in HSC involviert ist, auch wenn die Zugabe von rekombinantem FasL nur bei hohen Dosen Apoptose in HSC induzierte. Dies könnte damit zusammenhängen, dass FasL auf einer Oberfläche gebunden sein muss, um eine effektive Trimerisierung des Fas-Rezeptors zu ermöglichen, wodurch dann der Apoptoseprozess in den Zellen ausgelöst wird.

Neben TRAIL spielte im Mausmodell auch der aktivierende NK-Zell-Rezeptor NKG2D sowie die Granzym vermittelte Apoptose-Induktion in aktivierten HSC eine Rolle<sup>99,100</sup>. Darüber hinaus war IFN- $\gamma$  in der Lage, durch einen STAT-1 (*engl. signal transducer and activator of transcription 1*) abhängigen Mechanismus, Apoptose in HSC auszulösen<sup>98</sup>. Allerdings konnten nach der Koinkubation mit HSC nur sehr wenige IFN- $\gamma$  positive NK-Zellen detektiert werden, so dass dieser Signalweg eine eher untergeordnete Rolle spielen dürfte. Im Gegensatz dazu wurde eine erhöhte NK-Zell-Degranulation (CD107a) nach Koinkubation mit HSC gemessen, was für eine Apoptose-Induktion in den HSC durch den Granzym-vermittelten Signalweg spricht<sup>137</sup>. Dass hierfür die Aktivierung der NK-Zellen über den aktivierenden Rezeptor NKG2D induziert wird, konnte durch die Blockade von NKG2D gezeigt werden, welche zu einer fast kompletten Reduktion der NK-Zell-Degranulation führte. Außerdem ergab die Blockade von NKG2D auf NK-Zellen aus HCV-infizierten Patienten und IFN- $\alpha$  stimulierten NK-Zellen eine verringerte Apoptose-Induktion in HSC. Zusätzlich konnten durch den Nachweis von ULBP-1 und 2 sowie MICA/B bestätigt werden, dass die Liganden von NKG2D auf aktivierten HSC exprimiert werden.

Auf Grundlage dieser Beobachtung könnte eine HCV-induzierte Hochregulation von NKG2D auf NK-Zellen eine mögliche Erklärung für die stärkere anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen aus HCV-Patienten sein. Allerdings ist die Rolle von NKG2D im Rahmen einer HCV-Infektion bisher nur sehr uneinheitlich beschrieben und beschränkt sich meist auf die Analyse von peripheren NK-Zellen. So wurde eine niedrigere NKG2D-Expression auf peripheren NK-Zellen aus HCV-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden, wobei die korrespondierenden intrahepatischen NK-Zellen mehr NKG2D exprimierten<sup>148,149</sup>. Dagegen zeigten andere Studien eine höhere Frequenz an peripheren NKG2D positiven NK-Zellen, sowie eine stärkere NKG2D-Expression infolge einer HCV-

Infektion, die intrahepatisch sogar noch einmal erhöht war<sup>90,95,150</sup>. Keine Veränderung der NKG2D-Expression auf NK-Zellen wurde ebenfalls bei HCV-Patienten beschrieben und konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden<sup>151,152</sup>. Dieser Befund könnte eine Erklärung liefern, warum die Unterschiede bei der NKG2D-vermittelten NK-Zell-Degranulation zwischen gesunden und HCV-Probanden nur sehr gering ausfallen. Dennoch scheint NKG2D eine wichtige Rolle bei der NK-Zell-induzierten HSC Apoptose zu spielen.

Interessanterweise ergab die kombinierte Blockierung von TRAIL, FasL und NKG2D zwar die stärkste, aber keine komplette Hemmung der anti-fibrotischen Aktivität von NK-Zellen, so dass hier weitere Faktoren eine Rolle spielen müssen. In diesem Zusammenhang fanden zwei aktuelle Studien eine Beteiligung des NKp46-Rezeptors bei der anti-HSC Aktivität von NK-Zellen<sup>93,107</sup>. Bei NKp46 handelt es sich um einen aktivierenden NK-Zell-Rezeptor, der zur Gruppe der NCRs (*engl. natural cytotoxicity receptors*) gehört und fast ausschließlich auf NK-Zellen exprimiert wird. Darüber hinaus wurde die Bedeutung von NKp46 weiter untermauert, in dem der NKp46-Ligand auf aktivierten HSC nachgewiesen werden konnte<sup>107</sup>.

Zum Abschluss wurde die *in vivo* Relevanz der HCV-induzierten anti-fibrotischen Aktivität von NK-Zellen untersucht. Allerdings konnten aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Lebergewebe nur intrahepatische NK-Zellen von drei HCV-Patienten untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass auch intrahepatische NK-Zellen eine starke anti-HSC Aktivität aufweisen. Zusätzlich wurde eine Kolo-kalisierung von  $\alpha$ -SMA und aktiver Caspase-3 in Gewebeschnitten aus HCV-infizierten Lebern gefunden, was darauf hindeutet, dass apoptotische HSC tatsächlich in der Leber von HCV-Patienten vorkommen. In diesem Zusammenhang stellte Gonzalez et al. eine inverse Korrelation des Fibrosegrades mit der Anzahl der intrahepatischen apoptotischen HSC<sup>153</sup> fest. Die Progression einer Leberfibrose scheint also mit einer verminderten Apoptose-Induktion in HSC einherzugehen, die durch eine reduzierte NK-Zell-Aktivität verursacht werden könnte. Interessanterweise wurde in dieser Arbeit eine geringere anti-HSC-Aktivität von NK-Zellen gemessen, wenn die NK-Zellen aus Patienten mit einer F3/F4-Fibrose stammen. NK-Zellen aus Patienten mit keiner oder geringer Fibrose waren dagegen wesentlich effektiver bei der Apoptose-Induktion in HSC, wodurch die Fibrose-Entstehung verzögert

werden könnte. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine andere Studie, die ebenfalls eine inverse Korrelation der zytolytischen NK-Zell-Aktivität gegen K562-Zellen und dem Fibrosegrad fand<sup>154</sup>.

Im Gegensatz dazu scheint IFN- $\alpha$  diesen Effekt aufzuheben, da der Fibrosegrad bei IFN- $\alpha$  therapierten Patienten nicht mehr mit der NK-Zell Aktivität korreliert. Dies unterstreicht erneut die starke anti-fibrotische Wirkung von IFN- $\alpha$ .

Die Ursachen für den Verlust der anti-fibrotischen NK-Zell-Aktivität während der Fibroprogression sind dagegen unklar und wahrscheinlich durch mehrere Faktoren induziert. Eine Studie von Muhanna et al. schlägt eine Hochregulation der inhibitorischen Rezeptoren auf NK-Zellen als möglichen Mechanismus einer verringerten NK-Zell-Aktivität vor, da hier ein Trend zu einer höheren NKG2A-Expression auf NK-Zellen bei Patienten mit einer fortgeschrittenen Fibrose festgestellt wurde<sup>104</sup>. Eine gesteigerte Frequenz an NKG2A positiven NK-Zellen infolge einer HCV-Infektion konnte auch in einer früheren Arbeit demonstriert werden<sup>151</sup>. Darüber hinaus könnte eine Akkumulation von funktionell gestörten NK-Zellen in der Leber auftreten, wie es Eisenhardt et al. nachweisen konnte. Hier war eine erhöhte Anzahl an CXCR3(+) CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Leber, die eine verminderte anti-HSC-Aktivität infolge einer HCV-Infektion aufwiesen, mit einer fortgeschrittenen Fibrose assoziiert<sup>105</sup>. Eine weitere mögliche Erklärung für die reduzierte NK-Zell-Aktivität liefert Jeong et al., der in seiner Studie belegen konnte, dass im Vergleich zu früh aktivierten HSC, intermediär aktivierte HSC große Mengen an TGF- $\beta$  produzieren, welches als starker Inhibitor von NK-Zell-Funktionen bekannt ist<sup>102,155,156</sup>. Dementsprechend wurde eine verringerte Apoptose-Induktion in intermediär aktivierten HSC durch NK-Zellen gemessen, die durch einen blockierenden Antikörper gegen TGF- $\beta$  aufgehoben werden konnte<sup>103</sup>. Daneben führt TGF- $\beta$  nicht nur zu einer Hemmung der anti-fibrotischen NK-Zell-Aktivität, sondern auch zu einer Aktivierung von ruhenden HSC<sup>157</sup>, so dass TGF- $\beta$  eine starke pro-fibrotische Wirkung besitzt.

Neben dem Verlust der anti-fibrotischen Aktivität von NK-Zellen spielen wahrscheinlich auch Veränderungen in den HSC, die zu einer Resistenz gegenüber Apoptose-induzierenden Signalen führen, eine wichtige Rolle bei dem Fortschreiten der Leberfibrose. So waren im Mausmodell nur früh aktivierte HSC empfänglich für die Apoptosesignale von NK-Zellen, während in voll aktivierte HSC keine Apoptose durch NK-

Zellen ausgelöst werden konnte. Dies könnte mit dem Abbau des Vitamin A in Zusammenhang stehen, da hierdurch die Expression der NKG2D-Liganden REA-1 (*engl. retinoic acid inducible gene 1*) induziert wird. Durch den Verlust des Vitamin A wird auf voll aktivierten HSC kein REA-1 exprimiert, so dass die NK-Zellen nicht mehr aktiviert werden<sup>101</sup>. Zusätzlich führt die Phagozytose von apoptotischen Zellvesikeln durch HSC zu einer Resistenz gegenüber der FasL und TRAIL induzierten Apoptose in aktivierten HSC<sup>158</sup>.

All diese Befunde deuten auf ein komplexes Zusammenspiel von verschiedensten Faktoren hin, die bei der Entstehung einer Leberfibrose eine Rolle spielen. Außerdem liefern diese Studien eine mögliche Erklärung dafür, warum die meisten HCV-Patienten eine Leberfibrose entwickeln, obwohl die NK-Zellen, zumindest zu Beginn der Erkrankung, eine starke anti-fibrotische Aktivität besitzen.

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt der Arbeit gezeigt werden, dass NK-Zellen aus HCV-infizierten Patienten effektiv Apoptose über einen NKG2D, TRAIL und FasL abhängigen Signalweg in aktivierten HSC induzieren. Dabei war die anti-fibrotische Aktivität bei Patienten mit einer fortgeschrittenen Fibrose deutlich weniger effizient als bei Patienten, die keine Anzeichen einer Leberfibrose aufwiesen. Zusätzlich bewirkt die Behandlung mit IFN- $\alpha$  eine starke Zunahme der anti-HSC Aktivität von NK-Zellen, die durch eine Hochregulation des TRAIL-Liganden auf NK-Zellen ausgelöst wird. Diese Beobachtung liefert eine mögliche Erklärung, über welche Mechanismen IFN- $\alpha$  die oft beschriebene anti-fibrotische Wirkung entfaltet.

#### **5.4. Die Bedeutung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen im Rahmen der HIV/HCV-Koinfektion**

In einer Reihe von Studien konnte bisher gezeigt werden, dass eine Koinfektion mit HIV zu einer beschleunigten Progression der HCV-induzierten Leberfibrose führt<sup>36–38</sup>. Dabei scheint der HIV-assoziierte Verlust der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einem schnelleren Verlauf sowie einer fortgeschrittenen Leberfibrose einherzugehen<sup>38,44–52</sup>. Allerdings ist bisher unklar, durch welche Mechanismen CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Entwicklung einer Leberfibrose beeinflussen können. Daher beschäftigt sich der letzte Abschnitt dieser Dissertation mit dem Einfluss der CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die Fibroseprogression im Rahmen einer HIV/HCV-Koinfektion.

Wie bereits im Abschnitt 5.3 dargelegt, besitzen NK-Zellen durch Apoptose-Induktion in aktivierten HSC eine anti-fibrotische Aktivität. Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob CD4<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls in der Lage sind, Apoptose in aktivierten HSC zu induzieren und somit direkt anti-fibrotisch zu wirken. Allerdings löste der Überstand von CD3/CD28 aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen keine Apoptose in den HSC aus. Dagegen ergab die Koinkubation von CD3/CD28 aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit HSC zumindest bei hohen Zellzahlen eine leichte Zunahme der apoptotischen HSC. Dieser Effekt ist wahrscheinlich nicht auf die anti-HSC Aktivität von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zurückzuführen, sondern beruht auf der Kontamination mit NK-Zellen. Da in diesem Versuch sehr hohe Zellzahlen eingesetzt wurden, haben selbst geringe Verunreinigungen mit NK-Zellen (Kontrollmessungen ergaben einen NK-Zell-Anteil von max. 0,5 %) nach der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Isolation eine signifikante Auswirkung auf die Apoptose-Induktion in HSC. Darüber hinaus produzieren die CD3/CD38 stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen sehr große Mengen an IL-2, wie im weiteren Verlauf der Arbeit gezeigt wurde, wodurch die vorhandenen NK-Zellen stark aktiviert werden. Daher scheinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen keine oder zumindest nur eine sehr geringe direkte anti-fibrotische Aktivität zu besitzen, so dass der Einfluss auf die Fibroseprogression über einen indirekten Mechanismus vermittelt werden muss.

In diesem Zusammenhang zeigte Fehniger et al. bereits vor einigen Jahren, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen über einen IL-2 vermittelten Mechanismus in der Lage sind, die NK-Zell-Aktivität zu stimulieren<sup>159</sup>. Diese Beobachtung konnte in den darauffolgenden Jahren in mehreren Studien bestätigt werden<sup>160–166</sup>. Interessanterweise fand Vargas-Inchaustegui et al.



kürzlich erneut eine IL-2 abhängige Aktivierung der NK-Zell-Funktionen durch Antigen-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen in einem SIV (simianes Immundefizienz-Virus)-Infektionsmodell<sup>167</sup>. Die NK/CD4<sup>+</sup> T-Zell-Interaktion scheint also ebenfalls im Rahmen einer HIV-Infektion aufzutreten.

Aufgrund dieser Beobachtungen ist es von besonderem Interesse, dass NK-Zellen eine anti-fibrotische Aktivität besitzen, wie es bereits in dieser Dissertation (Abschnitt 5.3) sowie in einer ganzen Reihe weiterer Studien demonstriert werden konnte<sup>93,98–105,107</sup>. Daher wäre die CD4<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Regulation der anti-fibrotischen NK-Zell-Aktivität ein möglicher Mechanismus, wie CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Fibroseprogression modulieren könnten.

Tatsächlich konnte eine verstärkte anti-HSC-Aktivität von NK-Zellen beobachtet werden, nachdem diese mit dem Überstand von CD3/CD28 stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen inkubiert wurden. Dabei korreliert die NK-Zell-Aktivität mit der Anzahl der eingesetzten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, so dass von einem spezifischen Effekt ausgegangen werden kann. Die NK-Zell-Stimulation erfolgte hierbei durch einen kontaktunabhängigen, IL-2 vermittelten Mechanismus, wie anhand von verschiedenen Ergebnissen bestätigt werden konnte. So führte die Stimulation von NK-Zellen mit rekombinantem IL-2, genau wie der CD4 Überstand, zu einem dosisabhängigen Anstieg der NK-Zell induzierten HSC-Apoptose. Zudem konnte durch die Zugabe eines blockierenden IL-2 Antikörpers in den CD4<sup>+</sup> T-Zell-Überstand die NK-Zell-Aktivierung signifikant gehemmt werden. Darüber hinaus korrelierte die Frequenz der IL-2(+) CD4<sup>+</sup> T-Zellen positiv mit der anti-fibrotischen NK-Zell-Aktivität. Zuletzt konnte durch Bestrahlung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die infolge der DNA-Fragmentierung keine Zytokine mehr synthetisieren können, eine deutlich reduzierte NK-Zell-Stimulation durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen werden. All diese Befunde sprechen für eine entscheidende Rolle von IL-2 bei der CD4<sup>+</sup> T-Zell vermittelten Regulation der anti-fibrotischen NK-Zell-Aktivität. Allerdings führte die Neutralisation von IL-2 im CD4<sup>+</sup> T-Zell-Überstand nicht zu einer kompletten Aufhebung der anti-HSC-NK-Zell-Aktivität, was auf eine unzureichende Blockierungseffizienz des Antikörpers oder die Beteiligung von weiteren Zytokinen hindeutet. Da aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen neben IL-2 eine ganze Reihe von verschiedenen Zytokinen sekretieren<sup>115,168</sup>, kann ein Mitwirken von anderen Faktoren nicht ausgeschlossen werden.

Wie bereits in Abschnitt 5.3 dargelegt, sind der aktivierende NK-Zell-Rezeptor NKG2D sowie die Todesliganden TRAIL und FasL bei der Apoptose-Induktion in HSC involviert. Daher wurde die Bedeutung dieser Faktoren bei der CD4<sup>+</sup> T-Zell vermittelten NK-Zell-Aktivierung untersucht. Im Einklang mit früheren Studien<sup>169,170</sup> konnte eine Hochregulation von NKG2D auf NK-Zellen gemessen werden, wenn diese mit rekombinantem IL-2 oder CD4<sup>+</sup> T-Zell-Überstand behandelt wurden. Zusätzlich wurde die Bedeutung von NKG2D mit Hilfe von Blockierungsexperimenten untermauert, die zu einer deutlichen Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zell induzierten anti-fibrotischen NK-Zell-Aktivität führten. Einen Hinweis für die *in vivo* Relevanz der CD4<sup>+</sup> T-Zell vermittelten NKG2D Expression auf NK-Zellen lieferte die Frequenz der NKG2D(+) NK-Zellen und die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in HIV- und HIV/HCV-infizierten Patienten, welche positiv miteinander korrelierten.

Die Rolle von TRAIL ist dagegen weniger eindeutig. Zwar führte die Inkubation mit rekombinantem IL-2 oder CD4<sup>+</sup> T-Zell-Überstand zu einer erhöhten TRAIL-Expression auf NK-Zellen, die jedoch im Vergleich zur Stimulation mit IFN- $\alpha$  relativ gering ausfällt. Außerdem ergab die Blockierung von TRAIL im Vergleich zum Isotypen keine signifikante Reduktion der anti-HSC-Aktivität von NK-Zellen, so dass TRAIL wahrscheinlich eher eine untergeordnete Rolle bei der NK-Zell-Stimulation durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen spielt. Keinen Einfluss dürfte dagegen FasL haben, da weder die Expression durch den Überstand erhöht wurde, noch die Blockierungen mit einem Antikörper eine Verminderung der anti-fibrotischen NK-Zell-Aktivität erbrachte.

Zuletzt wurde der Fragestellung nachgegangen, in wieweit eine HIV/HCV-Koinfektion die CD4<sup>+</sup> T-Zell vermittelte NK-Zellen-Aktivierung beeinträchtigt. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass eine HIV-Monoinfektion mit einer verminderten IL-2 Sekretion bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit PHA (Phytohemagglutinin) oder LPS (Lipopolysaccharid) einhergeht<sup>171,172</sup>. Allerdings scheint auch eine HIV/HCV-Koinfektion mit einer reduzierten IL-2 Sekretion verbunden zu sein, da nach CD3/CD28 Stimulation die Frequenz der IL-2(+) CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant geringer war als bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus HCV-monoinfizierten Patienten und gesunden Probanden. Dementsprechend waren CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus HIV/HCV-koinfizierten Patienten weniger effektiv, die anti-fibrotische Aktivität von gesunden NK-Zellen zu stimulieren, als CD4<sup>+</sup> T-

Zellen aus HCV-monoinfizierten Patienten und gesunden Spendern. Interessanterweise besaßen NK-Zellen aus HIV/HCV-koinfizierten Patienten die geringste anti-fibrotische Aktivität der drei untersuchten Gruppen, wenn diese mit dem Überstand von gesunden CD4<sup>+</sup> T-Zellen inkubiert wurden. Im Einklang damit ergab die *ex vivo* Analyse von unstimulierten NK-Zellen aus HIV/HCV-koinfizierten Patienten, dass diese deutlich weniger effizient Apoptose in HSC auslösten, als NK-Zellen aus HCV-monoinfizierten Probanden. Daher scheinen neben den CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch zusätzlich die NK-Zellen infolge einer HIV/HCV-Koinfektion funktionell gestört zu sein, wie es zumindest für eine HIV-Monoinfektion mehrfach beschrieben wurde<sup>173–175</sup>. Die beschleunigte Fibroseprogression infolge einer HIV/HCV-Koinfektion dürfte also nicht nur auf den Verlust und die gestörte IL-2 Sekretion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zurückzuführen sein, sondern auch durch eine verminderte NK-Zell-Aktivität verursacht werden.

Zusammenfassend konnte in dem letzten Teil dieser Dissertation dargelegt werden, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lage sind, die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen über eine IL-2 abhängige Hochregulation von NKG2D zu stimulieren. Darüber hinaus wurde eine gestörte IL-2 Sekretion bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen infolge einer HIV/HCV-Koinfektion beobachtet, die mit einer verminderten Stimulation der anti-fibrotischen NK-Zell-Aktivität einherging. Daher könnte der HIV-assoziierte Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie die reduzierte IL-2 Sekretion zu einer beschleunigten Fibroseprogression bei einer HIV/HCV-Koinfektion beitragen. Außerdem konnte damit erstmalig eine mögliche Erklärung geliefert werden, warum die CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl mit der Fibroseprogression bei einer HIV/HCV-Koinfektion assoziiert ist.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;**244**:359–62.
- 2 Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver* 2009;**29 Suppl 1**:74–81.
- 3 Heintges T, Wands JR. Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. *Hepatology Baltim Md* 1997;**26**:521–6.
- 4 National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C 2002 (June 10-12, 2002). *Gastroenterology* 2002;**123**:2082–99.
- 5 Loomba R, Rivera MM, McBurney R, *et al.* The natural history of acute hepatitis C: clinical presentation, laboratory findings and treatment outcomes. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;**33**:559–65.
- 6 Maasoumy B, Wedemeyer H. Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012;**26**:401–12.
- 7 Thein H-H, Yi Q, Dore GJ, *et al.* Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology Baltim Md* 2008;**48**:418–31.
- 8 Di Bisceglie AM. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;**26**:34S–38S.
- 9 Terrault NA. Hepatitis C virus and liver transplantation. *Semin Gastrointest Dis* 2000;**11**:96–114.
- 10 Choo QL, Richman KH, Han JH, *et al.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;**88**:2451–5.
- 11 Yu X, Qiao M, Atanasov I, *et al.* Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology* 2007;**367**:126–34.
- 12 Simmonds P, Smith DB, McOmish F, *et al.* Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol* 1994;**75 ( Pt 5)**:1053–61.
- 13 Simmonds P, Bukh J, Combet C, *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology Baltim Md* 2005;**42**:962–73.
- 14 Lee C-M, Hung C-H, Lu S-N, *et al.* Hepatitis C virus genotypes: clinical relevance and therapeutic implications. *Chang Gung Med J* 2008;**31**:16–25.

- 15 Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;**358**:958–65.
- 16 Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;**347**:975–82.
- 17 Lehmann M, Meyer MF, Monazahian M, *et al.* High rate of spontaneous clearance of acute hepatitis C virus genotype 3 infection. *J Med Virol* 2004;**73**:387–91.
- 18 Wyles DL. Moving beyond interferon alfa: investigational drugs for hepatitis C virus infection. *Top HIV Med Publ Int AIDS Soc USA* 2010;**18**:132–6.
- 19 Alter MJ. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. *J Hepatol* 2006;**44**:S6–9.
- 20 Soriano V, Vispo E, Labarga P, *et al.* Viral hepatitis and HIV co-infection. *Antiviral Res* 2010;**85**:303–15.
- 21 Lacombe K, Rockstroh J. HIV and viral hepatitis coinfections: advances and challenges. *Gut* 2012;**61 Suppl 1**:i47–58.
- 22 Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981;**30**:250–2.
- 23 Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;**220**:868–71.
- 24 Dagleish AG, Beverley PC, Clapham PR, *et al.* The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984;**312**:763–7.
- 25 Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, *et al.* T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984;**312**:767–8.
- 26 Muñoz A, Wang MC, Bass S, *et al.* Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free time after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion in homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *Am J Epidemiol* 1989;**130**:530–9.
- 27 Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): : Cold Spring Harbor Laboratory Press 1997. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19376/> (accessed 13 May2013).
- 28 Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986;**233**:343–6.
- 29 Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, *et al.* HIV-1 Nomenclature Proposal. *Science* 2000;**288**:55–55.

- 30 Gilbert PB, McKeague IW, Eisen G, *et al.* Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Stat Med* 2003;**22**:573–93.
- 31 Winnock M, Salmon-Céron D, Dabis F, *et al.* Interaction between HIV-1 and HCV infections: towards a new entity? *J Antimicrob Chemother* 2004;**53**:936–46.
- 32 Sherman KE, O'Brien J, Gutierrez AG, *et al.* Quantitative evaluation of hepatitis C virus RNA in patients with concurrent human immunodeficiency virus infections. *J Clin Microbiol* 1993;**31**:2679–82.
- 33 Bonacini M, Govindarajan S, Blatt LM, *et al.* Patients co-infected with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus demonstrate higher levels of hepatic HCV RNA. *J Viral Hepat* 1999;**6**:203–8.
- 34 Yee TT, Griffioen A, Sabin CA, *et al.* The natural history of HCV in a cohort of haemophilic patients infected between 1961 and 1985. *Gut* 2000;**47**:845–51.
- 35 Daar ES, Lynn H, Donfield S, *et al.* Relation between HIV-1 and hepatitis C viral load in patients with hemophilia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 2001;**26**:466–72.
- 36 Martin P, Di Bisceglie AM, Kassianides C, *et al.* Rapidly progressive non-A, non-B hepatitis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Gastroenterology* 1989;**97**:1559–61.
- 37 Rockstroh JK, Spengler U, Sudhop T, *et al.* Immunosuppression may lead to progression of hepatitis C virus-associated liver disease in hemophiliacs coinfecting with HIV. *Am J Gastroenterol* 1996;**91**:2563–8.
- 38 Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, *et al.* Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. *Hepatology* 1999;**30**:1054–8.
- 39 Poynard T, Mathurin P, Lai C-L, *et al.* A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatology* 2003;**38**:257–65.
- 40 García-Samaniego J, Rodríguez M, Berenguer J, *et al.* Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2001;**96**:179–83.
- 41 Bruno R, Galastri S, Sacchi P, *et al.* gp120 modulates the biology of human hepatic stellate cells: a link between HIV infection and liver fibrogenesis. *Gut* 2010;**59**:513–20.
- 42 Tuyama AC, Hong F, Saiman Y, *et al.* Human immunodeficiency virus (HIV)-1 infects human hepatic stellate cells and promotes collagen I and monocyte chemoattractant protein-1 expression: implications for the pathogenesis of HIV/hepatitis C virus-induced liver fibrosis. *Hepatology* 2010;**52**:612–22.

- 43 Hong F, Saiman Y, Si C, *et al.* X4 Human immunodeficiency virus type 1 gp120 promotes human hepatic stellate cell activation and collagen I expression through interactions with CXCR4. *PloS One* 2012;**7**:e33659.
- 44 Benhamou Y, Di Martino V, Bochet M, *et al.* Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus-and hepatitis C virus-coinfected patients: impact of protease inhibitor therapy. *Hepatol Baltim Md* 2001;**34**:283–7.
- 45 Di Martino V, Rufat P, Boyer N, *et al.* The influence of human immunodeficiency virus coinfection on chronic hepatitis C in injection drug users: a long-term retrospective cohort study. *Hepatol Baltim Md* 2001;**34**:1193–9.
- 46 Mohsen AH, Easterbrook PJ, Taylor C, *et al.* Impact of human immunodeficiency virus (HIV) infection on the progression of liver fibrosis in hepatitis C virus infected patients. *Gut* 2003;**52**:1035–40.
- 47 Qurishi N, Kreuzberg C, Lüchters G, *et al.* Effect of antiretroviral therapy on liver-related mortality in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. *Lancet* 2003;**362**:1708–13.
- 48 Mariné-Barjoan E, Saint-Paul M-C, Pradier C, *et al.* Impact of antiretroviral treatment on progression of hepatic fibrosis in HIV/hepatitis C virus co-infected patients. *AIDS Lond Engl* 2004;**18**:2163–70.
- 49 Martín-Carbonero L, Benhamou Y, Puoti M, *et al.* Incidence and predictors of severe liver fibrosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic hepatitis C: a European collaborative study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2004;**38**:128–33.
- 50 Bräu N, Salvatore M, Ríos-Bedoya CF, *et al.* Slower fibrosis progression in HIV/HCV-coinfected patients with successful HIV suppression using antiretroviral therapy. *J Hepatol* 2006;**44**:47–55.
- 51 Pineda JA, García-García JA, Aguilar-Guisado M, *et al.* Clinical progression of hepatitis C virus-related chronic liver disease in human immunodeficiency virus-infected patients undergoing highly active antiretroviral therapy. *Hepatol Baltim Md* 2007;**46**:622–30.
- 52 Schiavini M, Angeli E, Mainini A, *et al.* Fibrosis progression in paired liver biopsies from HIV/HCV co-infected patients. *Hepat Mon* 2011;**11**:525–31.
- 53 Hepatic stellate cell nomenclature. *Hepatol Baltim Md* 1996;**23**:193.
- 54 Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008;**88**:125–72.
- 55 Giampieri MP, Jezequel AM, Orlandi F. The lipocytes in normal human liver. A quantitative study. *Digestion* 1981;**22**:165–9.

- 56 Horn T, Junge J, Christoffersen P. Early alcoholic liver injury. Activation of lipocytes in acinar zone 3 and correlation to degree of collagen formation in the Disse space. *J Hepatol* 1986;**3**:333–40.
- 57 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;**115**:209–18.
- 58 Wake K. 'Sternzellen' in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* 1971;**132**:429–62.
- 59 Geerts A. History, Heterogeneity, Developmental Biology, and Functions of Quiescent Hepatic Stellate Cells. *Semin Liver Dis* 2001;**21**:311–36.
- 60 Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, *et al.* Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;**82**:8681–5.
- 61 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;**275**:2247–50.
- 62 Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007;**131**:1728–34.
- 63 Gäbele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci J Virtual Libr* 2003;**8**:d69–77.
- 64 Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000;**46**:443–6.
- 65 D'Ambrosio R, Aghemo A, Rumi MG, *et al.* A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis. *Hepatology* 2012;**56**:532–43.
- 66 Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer J Int Cancer* 1975;**16**:216–29.
- 67 Kiessling R, Klein E, Wigzell H. 'Natural' killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 1975;**5**:112–7.
- 68 Hata K, Zhang XR, Iwatsuki S, *et al.* Isolation, phenotyping, and functional analysis of lymphocytes from human liver. *Clin Immunol Immunopathol* 1990;**56**:401–19.
- 69 Lanier LL, Testi R, Bindl J, *et al.* Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 1989;**169**:2233–8.
- 70 Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990;**76**:2421–38.



- 71 Hu PF, Hultin LE, Hultin P, *et al.* Natural killer cell immunodeficiency in HIV disease is manifest by profoundly decreased numbers of CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells and expansion of a population of CD16<sup>dim</sup>CD56<sup>-</sup> cells with low lytic activity. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology Off Publ Int Retrovirology Assoc* 1995;**10**:331–40.
- 72 Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J, *et al.* Characterization of CD56<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup> natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:2886–91.
- 73 Gonzalez VD, Falconer K, Michaëlsson J, *et al.* Expansion of CD56<sup>-</sup> NK cells in chronic HCV/HIV-1 co-infection: reversion by antiviral treatment with pegylated IFNalpha and ribavirin. *Clin Immunol Orlando Fla* 2008;**128**:46–56.
- 74 Gonzalez VD, Falconer K, Björkström NK, *et al.* Expansion of functionally skewed CD56-negative NK cells in chronic hepatitis C virus infection: correlation with outcome of pegylated IFN-alpha and ribavirin treatment. *J Immunol Baltim Md 1950* 2009;**183**:6612–8.
- 75 Björkström NK, Ljunggren H-G, Sandberg JK. CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends Immunol* 2010;**31**:401–6.
- 76 Lanier LL, Le AM, Civin CI, *et al.* The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950* 1986;**136**:4480–6.
- 77 Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;**22**:633–40.
- 78 Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, *et al.* Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 1989;**143**:3183–91.
- 79 Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley TJ, *et al.* Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med* 1990;**171**:1509–26.
- 80 Nagler A, Lanier LL, Phillips JH. Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo. *J Exp Med* 1990;**171**:1527–33.
- 81 Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;**16**:359–93.
- 82 Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990;**11**:237–44.
- 83 Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, *et al.* Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005;**42**:501–10.
- 84 Koch J, Steinle A, Watzl C, *et al.* Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol* 2013;**34**:182–91.

- 85 Stegmann KA, Björkström NK, Veber H, *et al.* Interferon-alpha-induced TRAIL on natural killer cells is associated with control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010;**138**:1885–97.
- 86 Degli-Esposti M. To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors. *J Leukoc Biol* 1999;**65**:535–42.
- 87 Bradley M, Zeytun A, Rafi-Janajreh A, *et al.* Role of spontaneous and interleukin-2-induced natural killer cell activity in the cytotoxicity and rejection of Fas+ and Fas-tumor cells. *Blood* 1998;**92**:4248–55.
- 88 Gao B, Radaeva S. Natural killer and natural killer T cells in liver fibrosis. *Biochim Biophys Acta* Published Online First: 26 September 2012. doi:10.1016/j.bbadis.2012.09.008
- 89 Lunemann S, Schlaphoff V, Cornberg M, *et al.* NK cells in hepatitis C: role in disease susceptibility and therapy. *Dig Dis Basel Switz* 2012;**30 Suppl 1**:48–54.
- 90 Oliviero B, Varchetta S, Paudice E, *et al.* Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 2009;**137**:1151–1160, 1160.e1–7.
- 91 Ahlenstiel G, Titerence RH, Koh C, *et al.* Natural killer cells are polarized toward cytotoxicity in chronic hepatitis C in an interferon-alfa-dependent manner. *Gastroenterology* 2010;**138**:325–335.e1–2.
- 92 Amadei B, Urbani S, Cazaly A, *et al.* Activation of natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2010;**138**:1536–45.
- 93 Krämer B, Körner C, Kebschull M, *et al.* Natural killer p46(High) expression defines a natural killer cell subset that is potentially involved in control of hepatitis C virus replication and modulation of liver fibrosis. *Hepatology* 2012;**56**:1201–13.
- 94 Edlich B, Ahlenstiel G, Zabaleta Azpiroz A, *et al.* Early changes in interferon signaling define natural killer cell response and refractoriness to interferon-based therapy of hepatitis C patients. *Hepatology* 2012;**55**:39–48.
- 95 Varchetta S, Mele D, Mantovani S, *et al.* Impaired intrahepatic natural killer cell cytotoxic function in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2012;**56**:841–9.
- 96 Kawarabayashi N, Seki S, Hatsuse K, *et al.* Decrease of CD56(+)T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;**32**:962–9.
- 97 Bonorino P, Ramzan M, Camous X, *et al.* Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C. *J Hepatology* 2009;**51**:458–67.

- 98 Jeong W-I, Park O, Radaeva S, *et al.* STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology* 2006;**44**:1441–51.
- 99 Radaeva S, Sun R, Jaruga B, *et al.* Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* 2006;**130**:435–52.
- 100 Melhem A, Muhanna N, Bishara A, *et al.* Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *J Hepatology* 2006;**45**:60–71.
- 101 Radaeva S, Wang L, Radaev S, *et al.* Retinoic acid signaling sensitizes hepatic stellate cells to NK cell killing via upregulation of NK cell activating ligand RAE1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;**293**:G809–816.
- 102 Jeong W-I, Park O, Gao B. Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008;**134**:248–58.
- 103 Jeong W-I, Park O, Suh Y-G, *et al.* Suppression of innate immunity (natural killer cell/interferon- $\gamma$ ) in the advanced stages of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2011;**53**:1342–51.
- 104 Muhanna N, Abu Tair L, Doron S, *et al.* Amelioration of hepatic fibrosis by NK cell activation. *Gut* 2011;**60**:90–8.
- 105 Eisenhardt M, Glässner A, Krämer B, *et al.* The CXCR3(+)CD56Bright phenotype characterizes a distinct NK cell subset with anti-fibrotic potential that shows dys-regulated activity in hepatitis C. *PloS One* 2012;**7**:e38846.
- 106 Glässner A, Eisenhardt M, Krämer B, *et al.* NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent manner. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 2012;**92**:967–77.
- 107 Gur C, Doron S, Kfir-Erenfeld S, *et al.* NKp46-mediated killing of human and mouse hepatic stellate cells attenuates liver fibrosis. *Gut* 2012;**61**:885–93.
- 108 Sagiv A, Biran A, Yon M, *et al.* Granule exocytosis mediates immune surveillance of senescent cells. *Oncogene* 2013;**32**:1971–7.
- 109 Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008;**112**:1557–69.
- 110 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;**136**:2348–57.

- 111 Killar L, MacDonald G, West J, *et al.* Cloned, Ia-restricted T cells that do not produce interleukin 4(IL 4)/B cell stimulatory factor 1(BSF-1) fail to help antigen-specific B cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 1987;**138**:1674–9.
- 112 Tao X, Constant S, Jorritsma P, *et al.* Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950* 1997;**159**:5956–63.
- 113 Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, *et al.* CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* 2012;**2012**:925135.
- 114 Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, *et al.* Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1987;**166**:1229–44.
- 115 Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;**7**:145–73.
- 116 Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;**76**:241–51.
- 117 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol Baltim Md 1950* 1995;**155**:1151–64.
- 118 Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 1976;**193**:1007–8.
- 119 Malek TR. The Biology of Interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 2008;**26**:453–79.
- 120 Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE, *et al.* Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* 1981;**291**:335–8.
- 121 Bonnema JD, Rivlin KA, Ting AT, *et al.* Cytokine-enhanced NK cell-mediated cytotoxicity. Positive modulatory effects of IL-2 and IL-12 on stimulus-dependent granule exocytosis. *J Immunol Baltim Md 1950* 1994;**152**:2098–104.
- 122 ISAACS A, LINDENMANN J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond Ser B Contain Pap Biol Character R Soc Gt Br* 1957;**147**:258–67.
- 123 Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, *et al.* Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2005;**23**:307–36.
- 124 Perry AK, Chen G, Zheng D, *et al.* The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res* 2005;**15**:407–22.
- 125 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;**26**:239–57.

- 126 Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 2000;**301**:5–17.
- 127 Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000;**407**:784–8.
- 128 Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, *et al.* Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950* 2003;**171**:4672–9.
- 129 Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* 2006;**1757**:1371–87.
- 130 Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;**326** ( Pt 1):1–16.
- 131 Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;**35**:495–516.
- 132 Martín-Vílchez S, Sanz-Cameno P, Rodríguez-Muñoz Y, *et al.* The hepatitis B virus X protein induces paracrine activation of human hepatic stellate cells. *Hepatol Baltim Md* 2008;**47**:1872–83.
- 133 Semela D, Das A, Langer D, *et al.* Platelet-derived growth factor signaling through ephrin-b2 regulates hepatic vascular structure and function. *Gastroenterology* 2008;**135**:671–9.
- 134 Coenen M, Nischalke HD, Krämer B, *et al.* Hepatitis C virus core protein induces fibrogenic actions of hepatic stellate cells via toll-like receptor 2. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 2011;**91**:1375–82.
- 135 Xu L, Hui AY, Albanis E, *et al.* Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005;**54**:142–51.
- 136 Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Investig Suppl* 1968;**97**:7.
- 137 Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 2004;**294**:15–22.
- 138 Ramadori G, Veit T, Schwögler S, *et al.* Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1990;**59**:349–57.
- 139 Rockey DC, Boyles JK, Gabbiani G, *et al.* Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1992;**24**:193–203.

- 140 Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru Y, *et al.* Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 2001;**187**:117–23.
- 141 Kasahara M, Yoshida S. Immunogenetics of the NKG2D ligand gene family. *Immunogenetics* 2012;**64**:855–67.
- 142 Yoon JC, Shiina M, Ahlenstiel G, *et al.* Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology* 2009;**49**:12–21.
- 143 Manabe N, Chevallier M, Chossegros P, *et al.* Interferon-alpha 2b therapy reduces liver fibrosis in chronic non-A, non-B hepatitis: a quantitative histological evaluation. *Hepatology* 1993;**18**:1344–9.
- 144 Cammà C, Giunta M, Linea C, *et al.* The effect of interferon on the liver in chronic hepatitis C: a quantitative evaluation of histology by meta-analysis. *J Hepatology* 1997;**26**:1187–99.
- 145 Poynard T, McHutchison J, Manns M, *et al.* Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;**122**:1303–13.
- 146 Shiffman ML, Hofmann CM, Contos MJ, *et al.* A randomized, controlled trial of maintenance interferon therapy for patients with chronic hepatitis C virus and persistent viremia. *Gastroenterology* 1999;**117**:1164–72.
- 147 Sobesky R, Mathurin P, Charlotte F, *et al.* Modeling the impact of interferon alfa treatment on liver fibrosis progression in chronic hepatitis C: a dynamic view. The Multivirc Group. *Gastroenterology* 1999;**116**:378–86.
- 148 Sène D, Levasseur F, Abel M, *et al.* Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NS5A-mediated imbalance of inflammatory cytokines. *PLoS Pathog* 2010;**6**:e1001184.
- 149 Alter G, Jost S, Rihn S, *et al.* Reduced frequencies of NKp30+NKp46+, CD161+, and NKG2D+ NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. *J Hepatology* 2011;**55**:278–88.
- 150 Varchetta S, Oliviero B, Francesca Donato M, *et al.* Prospective study of natural killer cell phenotype in recurrent hepatitis C virus infection following liver transplantation. *J Hepatology* 2009;**50**:314–22.
- 151 Nattermann J, Feldmann G, Ahlenstiel G, *et al.* Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut* 2006;**55**:869–77.
- 152 De Maria A, Fogli M, Mazza S, *et al.* Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur J Immunol* 2007;**37**:445–55.

- 153 Gonzalez SA, Fiel MI, Sauk J, *et al.* Inverse association between hepatic stellate cell apoptosis and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2009;**16**:141–8.
- 154 Morishima C, Paschal DM, Wang CC, *et al.* Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatology* 2006;**43**:573–80.
- 155 Dasgupta S, Bhattacharya-Chatterjee M, O'Malley BW Jr, *et al.* Inhibition of NK cell activity through TGF-beta 1 by down-regulation of NKG2D in a murine model of head and neck cancer. *J Immunol* 2005;**175**:5541–50.
- 156 Yu J, Wei M, Becknell B, *et al.* Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Immunity* 2006;**24**:575–90.
- 157 Meyer DH, Bachem MG, Gressner AM. Modulation of hepatic lipocyte proteoglycan synthesis and proliferation by Kupffer cell-derived transforming growth factors type beta 1 and type alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;**171**:1122–9.
- 158 Jiang JX, Mikami K, Venugopal S, *et al.* Apoptotic body engulfment by hepatic stellate cells promotes their survival by the JAK/STAT and Akt/NF-kappaB-dependent pathways. *J Hepatol* 2009;**51**:139–48.
- 159 Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, *et al.* CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003;**101**:3052–7.
- 160 He X-S, Draghi M, Mahmood K, *et al.* T cell-dependent production of IFN-gamma by NK cells in response to influenza A virus. *J Clin Invest* 2004;**114**:1812–9.
- 161 Horowitz A, Behrens RH, Okell L, *et al.* NK cells as effectors of acquired immune responses: effector CD4+ T cell-dependent activation of NK cells following vaccination. *J Immunol* 2010;**185**:2808–18.
- 162 Horowitz A, Newman KC, Evans JH, *et al.* Cross-talk between T cells and NK cells generates rapid effector responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Immunol* 2010;**184**:6043–52.
- 163 McCall MBB, Roestenberg M, Ploemen I, *et al.* Memory-like IFN-γ response by NK cells following malaria infection reveals the crucial role of T cells in NK cell activation by P. falciparum. *Eur J Immunol* 2010;**40**:3472–7.
- 164 Horowitz A, Hafalla JCR, King E, *et al.* Antigen-specific IL-2 secretion correlates with NK cell responses after immunization of Tanzanian children with the RTS,S/AS01 malaria vaccine. *J Immunol* 2012;**188**:5054–62.
- 165 Gasteiger G, Hemmers S, Bos PD, *et al.* IL-2-dependent adaptive control of NK cell homeostasis. *J Exp Med* 2013;**210**:1179–87.

- 166 Kerdiles Y, Ugolini S, Vivier E. T cell regulation of natural killer cells. *J Exp Med* 2013;**210**:1065–8.
- 167 Vargas-Inchaustegui DA, Xiao P, Tuero I, *et al.* NK and CD4+ T cell cooperative immune responses correlate with control of disease in a macaque simian immunodeficiency virus infection model. *J Immunol Baltim Md 1950* 2012;**189**:1878–85.
- 168 Senik A, Stefanos S, Kolb JP, *et al.* Enhancement of mouse natural killer cell activity by type II interferon. *Ann Immunol* 1980;**131C**:349–61.
- 169 Song H, Hur DY, Kim K-E, *et al.* IL-2/IL-18 prevent the down-modulation of NKG2D by TGF-beta in NK cells via the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Cell Immunol* 2006;**242**:39–45.
- 170 Konjević G, Mirjačić Martinović K, Vuletić A, *et al.* In-vitro IL-2 or IFN- $\alpha$ -induced NKG2D and CD161 NK cell receptor expression indicates novel aspects of NK cell activation in metastatic melanoma patients. *Melanoma Res* 2010;**20**:459–67.
- 171 Ostrowski SR, Gerstoft J, Pedersen BK, *et al.* Impaired production of cytokines is an independent predictor of mortality in HIV-1-infected patients. *AIDS Lond Engl* 2003;**17**:521–30.
- 172 Erikstrup C, Kronborg G, Lohse N, *et al.* T-cell dysfunction in HIV-1-infected patients with impaired recovery of CD4 cells despite suppression of viral replication. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 2010;**53**:303–10.
- 173 Cai Q, Huang XL, Rappocciolo G, *et al.* Natural killer cell responses in homosexual men with early HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990;**3**:669–76.
- 174 Sirianni MC, Mezzaroma I, Aiuti F, *et al.* Analysis of the cytolytic activity mediated by natural killer cells from acquired immunodeficiency syndrome patients in response to phytohemagglutinin or anti-CD16 monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 1994;**24**:1874–8.
- 175 De Maria A, Fogli M, Costa P, *et al.* The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *Eur J Immunol* 2003;**33**:2410–8.



## 7. Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität ( <i>engl. antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i> )
AIDS	erworbenes Immunschwächesyndrom ( <i>engl. acquired immune deficiency syndrome</i> )
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Allophycocyanin
ART	antiretrovirale Therapie
$\alpha$ -SMA	<i>engl. <math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
BFA	Brefeldin A
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>engl. bovine serum albumine</i> )
bzw.	beziehungsweise
CAD	Caspase-aktivierte DNase
Caspasen	<b>C</b> ystein abhängige <b>A</b> spartat-spezifische <b>P</b> roteasen
cDNA	komplementäre DNA ( <i>engl. complementary DNA</i> )
CD	<i>engl. cluster of differentiation</i>
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
cm	Zentimeter
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
Da	Dalton
DMEM	<i>engl. Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
E:T-Verhältnis	Effektor:Target-Verhältnis
<i>et al.</i>	und andere ( <i>lat. et aliter</i> )
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellsortierer ( <i>engl. fluorescence activated cell sorting</i> )
FasL	Fas-Ligand
FCS	fötales Kälberserum ( <i>engl. fetal calf serum</i> )

FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>engl. forward scatter</i> )
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
gp	Glykoprotein
GT	Glutamyl-Transferase
h	Stunde
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom ( <i>engl. hepatocellular carcinoma</i> )
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HSC	hepatische Sternzellen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iTreg	induzierten regulatorischen T-Zellen
IU	internationale Einheiten ( <i>engl. international units</i> )
K	Kilo
KIR	immunglobulinähnliche Killerzellenrezeptoren ( <i>engl. killer cell immunoglobulin like receptors</i> )
l	Liter
LAMP-1	Lysosomen assoziiertes Membran-Protein-1
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
m	Milli, Meter
μ	Mikro
MACS	magnetischer Zellsortierer ( <i>engl. magnetic activated cell sorter</i> )
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex ( <i>engl. major histocompatibility complex</i> )
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinasen

MSM	Geschlechtsverkehr unter Männern ( <i>engl. men who have sex with men</i> )
n	nano, Anzahl
NCR	natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren ( <i>engl. natural cytotoxicity receptors</i> )
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
n.s.	nicht signifikant
OD	optischen Dichte
p	statistische Wahrscheinlichkeit
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen ( <i>engl. peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>engl. phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>engl. polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>lat. potentia Hydrogenii</i>
PHA	Phytohemagglutinin
PRR	Muster-Erkennungsrezeptoren ( <i>engl. pattern recognition receptors</i> )
RBV	Ribavirin
REA	Retinolsäure- induziertes Gen ( <i>engl. retinoic acid inducible gene</i> )
RFI	relative Fluoreszenzintensität
rh	rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>engl. standard error of mean</i> )

SIV	simianes Immundefizienz-Virus
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>engl. side scatter</i> )
STAT	Signaltransduzierer und Transkriptionsaktivierer ( <i>engl. signal transducer and activator of transcription 1</i> )
SVR	dauerhaftes virologisches Ansprechen ( <i>engl. sustained virological response</i> )
TIMP	Gewebe-Inhibitoren von Metalloproteinasen ( <i>engl. tissue inhibitors of metalloproteinases</i> )
TGF	transformierender Wachstumsfaktor ( <i>engl. transforming growth factor</i> )
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand ( <i>engl. TNF-related apoptosis inducing ligand</i> )
TUNEL	<i>engl. TdT-mediated dUTP nick end labelling</i>
U	Unit(s), Einheit von Enzymaktivität
ULBP1-6	UL16 bindendes Protein 1-6
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>engl. weight per volume</i> )
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius

## 8. Veröffentlichungen

Auszüge aus dieser Arbeit waren Bestandteil folgender Publikationen und Kongressbeiträge:

### Publikationen als Erstautor:

1. **Andreas Glässner**, Marianne Eisenhardt, Pavlos Kokordelis, Benjamin Krämer, Franziska Wolter, Hans-Dieter Nischalke, Christoph Boesecke, Tilman Sauerbruch, Jürgen K. Rockstroh, Ulrich Spengler and Jacob Nattermann; Impaired CD4<sup>+</sup> T cell stimulation of NK cell anti-fibrotic activity may contribute to accelerated liver fibrosis progression in HIV/HCV patients. *Journal of Hepatology* Mai 2013 (Epub ahead of print)
2. **Andreas Glässner**, Marianne Eisenhardt, Benjamin Krämer, Christian Körner, Martin Coenen, Tilman Sauerbruch, Ulrich Spengler and Jacob Nattermann; NK cells from HCV-infected patients induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL-, and NKG2D-dependent manner. *Laboratory Investigation* 2012; 92: 967–977

### Publikationen als Koautor:

1. Marianne Eisenhardt, **Andreas Glässner**, Benjamin Krämer, Christian Körner, Bernhard Sibbing, Pavlos Kokordelis, Hans Dieter Nischalke, Tilman Sauerbruch, Ulrich Spengler and Jacob Nattermann; The CXCR3(+)CD56Bright Phenotype Characterizes a Distinct NK Cell Subset with Anti-Fibrotic Potential That Shows Dys-Regulated Activity in Hepatitis C. *PLoS ONE* 2012; 7(7)
2. Benjamin Krämer, Christian Körner, Moritz Kebschull, **Andreas Glässner**, Marianne Eisenhardt, Hans Dieter Nischalke, Michael Alexander, Tilman Sauerbruch, Ulrich Spengler and Jacob Nattermann; NKp46(High) expression defines a NK cell subset that is potentially involved in control of HCV replication and modulation of liver fibrosis. *Hepatology* 2012; 56(4):1201-13

3. Christian Körner, Katarina Riesner, Benjamin Krämer, Marianne Eisenhardt, **Andreas Glässner**, Franziska Wolter, Thomas Berg, Tobias Müller, Tilman Sauerbruch, Jacob Nattermann, Ulrich Spengler and Hans Dieter Nischalke; TRAIL receptor I (DR4) polymorphisms C626G und A683C are associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma (HCC) in HCV-infected patients. *BMC Cancer* 2012; 12:85
4. Benjamin Krämer, Marianne Eisenhardt, **Andreas Glässner**, Christian Körner, Tilman Sauerbruch, Ulrich Spengler, Jacob Nattermann; Do  $\lambda$ -interferons IL28A and IL28B act on human natural killer cells? *PNAS* letter 8/2011
5. Martin Coenen, Hans Dieter Nischalke, Benjamin Krämer, Bettina Langhans, **Andreas Glässner**, Daniela Schulte, Christian Körner, Tilman Sauerbruch, Jacob Nattermann and Ulrich Spengler; Hepatitis C virus core protein induces fibrogenic actions of hepatic stellate cells via toll-like receptor 2. *Laboratory Investigation* 2011; 91: 1375-1382

### Kongressbeiträge:

#### Vorträge:

- 2012** DGVS (Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten) in Hamburg, Titel: Gestörte CD4<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Aktivierung von NK Zellen als möglicher Mechanismus der hepatischen Fibrogenese bei der HIV/HCV-Koinfektion.

#### Poster:

- 2013** GASL (German Association for the Study of the Liver) in Hannover, Titel: NK-Zellen aus HIV/HCV koinfizierten Patienten besitzen im Vergleich zu HCV monoinfizierten Patienten eine verminderte anti-fibrotische Aktivität.

CROI 2013 (Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections) in Atlanta, Titel: "Impaired NKG2D- and NKp46-mediated anti-fibrotic NK cell activity may be involved in faster liver fibrosis progression in HIV/HCV co-infected patients.

- 2012** GASL (German Association for the Study of the Liver) in Hamburg, Titel: HCV-vermittelte Blockierung der IL-2 Sekretion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen hemmt die anti-fibrotische Aktivität von NK-Zellen.

CROI 2012 (Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections) in Seattle, Titel: Loss of CD4<sup>+</sup> T cells may impair anti-fibrotic activity of NK cells in HIV/HCV co-infection.

EASL (European Association for the Study of the Liver) in Barcelona, Titel: Impaired CD4<sup>+</sup> T cell-mediated stimulation of NK cell anti-fibrotic activity may contribute to accelerated progression towards HCV-associated liver fibrosis in HIV/HCV co-Infected patients.

AASLD (American Association of the Study of Liver Diseases) in Boston, Titel: CD4<sup>+</sup> T cells effectively trigger anti-fibrotic activity of NK cells via IL-2 induced up-regulation of NKG2D.

- 2011** GASL (German Association for the Study of the Liver) in Regensburg, Titel: Natürliche Killer-Zellen aus HCV-infizierten Patienten induzieren effektiv Apoptose von aktivierten primären humanen hepatischen Sternzellen.

CROI 2011 (Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections) in Boston, Titel: NK Cells from HIV/HCV-Infected Patients Have an Impaired Capability to Induce Apoptosis of Activated Primary Human Hepatic Stellate Cells.

EASL (European Association for the Study of the Liver) in Berlin, Titel: Interferon- $\alpha$  mediated activation of natural killer cells is associated with efficient induction of apoptosis of activated primary human hepatic stellate.

EASL Monothematic Conference (Liver Fibrogenesis) in Bonn, Titel: NK cells from HCV-infected patients are highly efficient in inducing apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells.

**2010** NK cell 2010 in Dubrovnik, Titel: NK cells from HCV-infected patients are highly efficient in inducing apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells.

AASLD (American Association of the Study of Liver Diseases) in Boston, Titel: NK cells from HCV-infected patients are highly efficient in inducing apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit persönlich, selbstständig und unter Offenlegung der erhaltenen Hilfen angefertigt habe.

Die vorliegende Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht. Ich habe früher noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Bonn, den 1. August 2013

Andreas Glässner